

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 15/12

C07K 16/18 A61K 39/395

A61K 38/03 A61P 35/02



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01807591.6

[43] 公开日 2003 年 6 月 4 日

[11] 公开号 CN 1422333A

[22] 申请日 2001.3.12 [21] 申请号 01807591.6  
[30] 优先权  
[32] 2000. 3.10 [33] US [31] 09/523,095  
[32] 2000. 4.17 [33] JP [31] 115246/2000  
[32] 2000.10.20 [33] JP [31] 321822/2000  
[86] 国际申请 PCT/JP01/01912 2001.3.12  
[87] 国际公布 WO01/66737 日 2001.9.13  
[85] 进入国家阶段日期 2002.9.29  
[71] 申请人 中外制药株式会社  
地址 日本东京  
[72] 发明人 福岛直 土屋政幸 大枝匡义  
宇野慎介 菊地康文

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所  
代理人 刘晓东

权利要求书 1 页 说明书 43 页 序列表 41 页  
附图 38 页

[54] 发明名称 诱导细胞凋亡的多肽

[57] 摘要

本发明涉及重建的多肽，其特性在于可诱导具有整合素相关蛋白质(IAP)的有核血细胞凋亡，而不引起血细胞凝集反应。该重建多肽包含一种单克隆抗体的二个或多个 H 链 V 区以及二个或多个 L 链 V 区，该单克隆抗体可诱导具有 IAP 的有核血细胞凋亡。该重建多肽可用作血液病，例如白血病的治疗剂。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 重建的多肽，可结合整合素相关蛋白质（IAP），诱导有核血细胞凋亡，而不引起血细胞凝集反应。
2. 权利要求1的重建多肽，其中该重建多肽是改型抗体。
3. 权利要求2的重建多肽，其中该改型抗体包含单克隆抗体的两个或多个H链V区以及两个或多个L链V区。
4. 权利要求3的重建多肽，其中该重建多肽是包含H链V区和L链V区的单链Fv的二聚体。
5. 权利要求1-4中任一项的重建多肽，其中该重建多肽是纯化的单链Fv的二聚体。
6. 权利要求3的重建多肽，其中多肽是包含2个H链V区和2个L链V区的单链多肽。
7. 权利要求5或6的重建多肽，其中的H链V区和L链V区通过包含至少一个氨基酸的接头相连。
8. 权利要求4、5和7中任一项的单链Fv的编码DNA。
9. 权利要求6或7的多肽的编码DNA。
10. 权利要求1-3中任一项的重建多肽，其中H链V区和/或L链V区是人源化的。
11. 权利要求10的多肽的编码DNA。
12. 动物细胞，其可产生权利要求1、2、3、4、5、6、7和10中任一项的重建多肽。
13. 微生物，其可产生权利要求1、2、3、4、5、6、7和10中任一项的重建多肽。
14. 血液病的治疗剂，其包含权利要求1、2、3、4、5、6、7和10之中任何一项的重建多肽作为其活性成分。
15. 权利要求14的治疗剂，其特征不在于该血液病是白血病。
16. 权利要求14的治疗剂，其特征不在于该活性成分是权利要求4、5和7中任何一项的单链Fv。

## 诱导细胞凋亡的多肽

### 技术领域

本发明涉及一种重建的多肽，其特性在于可诱导具有整合素相关蛋白质（Integrin Associated Protein, IAP）的有核血细胞凋亡，而不引起血细胞凝集反应。本发明尤其涉及重建的多肽，其包含单克隆抗体的二个或多个H链V区以及二个或多个L链V区，该单克隆抗体可诱导具有IAP的有核血细胞凋亡。该重建的多肽可用作血液病，例如白血病的治疗剂。

### 背景技术

日本专利申请 9-67499 公开了以脾基质细胞系作为致敏抗原的特异性单克隆抗体的制备，其目的在于开发可识别上述脾基质细胞的特异性抗体，并公开了将小鼠整合素相关蛋白质（小鼠 IAP）作为抗原识别的新型单克隆抗体的制备。JP-Appl. 9-67499 还公开了这些单克隆抗体能够诱导骨髓细胞凋亡。

W099/12973 公开了其抗原是人整合素相关蛋白质（此处引用为人 IAP；其氨基酸序列和核苷酸序列如 J. Cell Biol., 123, 485-496, 1993；也参见 Journal of cell Science, 108, 3419-3425, 1995）的单克隆抗体，其能够诱导具有该人 IAP 的人有核血细胞（髓系细胞和淋巴系）凋亡。这些单克隆抗体记为抗体 MABL-1 和抗体 MABL-2，产生这些抗体的杂交瘤也分别记为 MABL-1（FERM BP-6100）和 MABL-2（FERM BP-6101）。

日本专利申请 11-63557 描述了具有以人 IAP 为抗原的单克隆抗体的单链 Fv 区的单链 Fvs 的制备。该单链 Fvs 能够诱导具有人 IAP 的有核血细胞凋亡。

识别 IAP 作为抗原的单克隆抗体，可诱导具有人 IAP 的有核血细

胞凋亡，但体外也引起血细胞凝集反应。表明给予大剂量识别 IAP 为抗原的单克隆抗体，可产生副作用，例如血细胞凝集反应。

## 发明内容

本发明的一个目的在于提供重建的多肽，它具有改进的特性，可诱导具有整合素相关蛋白质（IAP）的有核血细胞凋亡，以及降低或完全消除了其引起血细胞凝集反应的特性。本发明的另一个目的在于提供血液病的治疗剂，其包含上述获得的、可诱导具有整合素相关蛋白质的有核血细胞凋亡的物质。

因此，本发明涉及重建的多肽，其可结合整合素相关蛋白质（IAP），诱导具有 IAP 的有核血细胞凋亡，而不引起血细胞凝集反应。

本发明还涉及重建的多肽、改型（reshaped）的抗体。

改型的抗体可以包括任何重建的多肽，其包含来源于单克隆抗体（例如抗体 MABL-1、抗体 MABL-2、或等等可诱导具有 IAP，优选人 IAP 的有核血细胞凋亡的抗体）的 L 链 V 区和 H 链 V 区，该多肽可诱导具有 IAP，优选人 IAP 的有核血细胞凋亡，而不引起血细胞凝集反应。此外，本发明也包括其中 V 区氨基酸序列部分改变的重建多肽。

本发明还涉及该重建多肽的人源化。人源化的重建多肽包含人源化的 L 链 V 区和/或人源化的 H 链 V 区。具体地，本发明的人源化多肽包括：人源化的 L 链 V 区，其包含来源于人单克隆抗体 L 链 V 区的框架区（FR）以及来源于小鼠单克隆抗体 L 链 V 区的 CDR 和/或人源化的 H 链 V 区，其包含来源于人单克隆抗体 H 链 V 区的 FR 以及来源于小鼠单克隆抗体 H 链 V 区的 CDR。在这种情况下，可部分改变 FR 或 CDR 的氨基酸序列，例如缺失、替换或增加。

此外，本发明涉及能够诱导具有人 IAP 的有核血细胞凋亡的重建多肽，该多肽包含人抗体的 L 链 C 区和小鼠单克隆抗体的 L 链 V 区，和/或人抗体的 H 链 C 区和小鼠单克隆抗体的 H 链 V 区。

本发明还涉及诱导具有人 IAP 的有核血细胞凋亡的重建多肽，该多肽包含对应于上述小鼠 CDR、源于小鼠以外的其它哺乳动物，例如

人、大鼠、牛、羊等的单克隆抗体的 CDR，或者包含上述 CDR 的 L 链 V 区和 H 链 V 区。这些 CDR、L 链 V 区和 H 链 V 区可以包括源于例如由转基因鼠等制备的人单克隆抗体的 CDR，以及源于包含上述 CDR 的人单克隆抗体的 L 链 V 区和 H 链 V 区。

本发明也涉及上述各种重建多肽的编码 DNA，以及用于制备包含该 DNA 的重组载体的基因工程技术。

本发明还涉及用重组载体转化的宿主细胞。宿主细胞的例子包括哺乳动物细胞，例如人细胞、小鼠细胞等，以及微生物，例如大肠杆菌 (*E. coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、酵母等。

本发明涉及产生重建多肽的方法，包括培养上述宿主，并从其培养物中提取该重建多肽。

本发明另外涉及产生单链 Fv 二聚体的方法，包括在无血清培养基中培养可产生该单链 Fv 的哺乳动物宿主细胞，以分泌单链 Fv 到培养基中，并分离培养基中形成的单链 Fv 二聚体。

本发明涉及血液病的治疗剂，其中包含上述获得的重建多肽作为活性成份，该多肽可诱导具有整合素相关蛋白质 (IAP) 的有核血细胞凋亡。本发明的血液病的治疗剂，可用于治疗血液病，例如白血病，如急性髓细胞性白血病、慢性骨髓性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性成淋巴细胞性白血病、成人 T 细胞白血病、多发性骨髓瘤、混合型白血病和毛细胞白血病、恶性淋巴瘤 (何杰金氏病、非何杰金氏淋巴瘤)、再生障碍性贫血、骨髓发育不良综合症以及真性红细胞增多症。

本发明的重建多肽优选地包含源于单克隆抗体的 2 个 H 链 V 区和 2 个 L 链 V 区。该重建多肽的结构可以是包含 1 个 H 链 V 区和 1 个 L 链 V 区的单链 Fv 的二聚体，或者是包含 2 个 H 链 V 区和 2 个 L 链 V 区的多肽。在本发明的重建多肽中，H 链 V 区和 L 链 V 区优选地通过包含一个或多个氨基酸的肽接头相连。产生的重建多肽包含亲本抗体的可变区，并保留其互补性决定区 (CDR)，因此其结合抗原的特异性与亲本单克隆抗体相同。

## H 链 V 区

本发明源于单克隆抗体的 H 链 V 区，可以是诱导具有 IAP 的有核血细胞凋亡的单克隆抗体的 H 链 V 区，或其氨基酸序列部分改变的 H 链 V 区，优选的是识别人 IAP 并诱导具有 IAP 的有核血细胞凋亡的单克隆抗体的 H 链 V 区，或其氨基酸序列部分改变的 H 链 V 区。优选源于抗体 MABL-1 或抗体 MABL-2 的 H 链 V 区，或其氨基酸序列部分改变的 H 链 V 区。更优选是人源化的 H 链 V 区，其包含人单克隆抗体 H 链 V 区的 FR，以及小鼠单克隆抗体 H 链 V 区的 CDR。H 链 V 区进一步可是源于人单克隆抗体、对应于上述小鼠单克隆抗体 H 链 V 区的区域，可以利用重组技术产生。本发明的 H 链 V 区可以是保留抗原结合能力的上述 H 链 V 区的片段。

## L 链 V 区

本发明的 L 链 V 区可以是诱导具有 IAP 的有核血细胞凋亡的单克隆抗体的 L 链 V 区，或其氨基酸序列部分改变的 L 链 V 区，优选的是识别人 IAP 并诱导具有 IAP 的有核血细胞凋亡的单克隆抗体的 L 链 V 区，或其氨基酸序列部分改变的 L 链 V 区。优选源于抗体 MABL-1 或抗体 MABL-2 的 L 链 V 区，或其氨基酸序列部分修饰的 L 链 V 区。更优选人源化的 L 链 V 区，其包含人单克隆抗体 L 链 V 区的 FR，以及小鼠单克隆抗体 L 链 V 区的 CDR。L 链 V 区进一步可以是源于人单克隆抗体、对应于上述小鼠单克隆抗体 L 链 V 区的区域，可以利用重组技术产生。本发明的 L 链 V 区可以是保留抗原结合能力的上述 L 链 V 区的片段。

## 互补性决定区 (CDR)

L 链和 H 链的每个 V 区形成抗原结合位点。L 和 H 链的可变区由相当保守的 4 个共同框架区组成，与 3 个高度可变区或互补性决定区 (CDR) 相连 (Kabat, E.A. 等人, "Sequences of Protein of Immunological Interest", US Dept. Health and Human Services, 1983)。

4 个框架区 (FR) 中的主要部分形成  $\beta$ -片层结构，3 个 CDR 形成环。某些情况下，CDR 可形成片层结构的一部分。3 个 CDR 在空间位置

上通过 FR 互相接近, 连同 3 个 CDR 形成抗原结合结点。

根据 Kabat, E. A. 等人“Sequences of Protein of Immunological Interest”中的经验规则, 将获得的抗体 V 区氨基酸序列与已知抗体 V 区的已知氨基酸序列比较, 来鉴定这些 CDR。

### 单链 Fv

单链 Fv 是多肽单体, 包含互相连接的源于单克隆抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区。产生的单链 Fv 包含亲本单克隆抗体的可变区, 并保留其互补性决定区, 因此具有与亲本单克隆抗体相同的抗原结合特异性 (JP-App1. 11-63557)。本发明单链 Fv 的可变区和/或 CDR 的一部分, 或其氨基酸序列的一部分可以部分改变, 例如缺失、替换或增加。前已述及构成本发明单链 Fv 的 H 链 V 区和 L 链 V 区, 它们可以直接连接或通过接头相连, 优选肽接头。单链 Fv 的构造可以是 [H 链 V 区]-[L 链 V 区], 或者 [L 链 V 区]-[H 链 V 区]。本发明中, 单链 Fv 能形成二聚体、三聚体或可以是包括在本发明重建多肽中的四聚体。

### 单链重建多肽

本发明的包含两个或多个 H 链 V 区以及两个或多个 L 链 V 区的单链重建多肽, 包含上述的两个或多个 H 链 V 区和 L 链 V 区。应当安排肽的每个区, 使重建单链多肽形成特定的空间结构, 精确地模拟由单链 Fv 二聚体形成的空间结构。例如, 按下列顺序安排 V 区: [H 链 V 区]-[L 链 V 区]-[H 链 V 区]-[L 链 V 区]; 或者 [L 链 V 区]-[H 链 V 区]-[L 链 V 区]-[H 链 V 区], 其中这些区域分别通过肽接头相连。

### 接头

本发明中, 连接 H 链 V 区和 L 链 V 区之间的接头可以是能通过基因工程方法引入的任何肽接头, 或者是化学合成的任何接头。例如, 本发明可以使用文献中公开的接头, 如 Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996。肽接头的例子包括, 例如:

Ser

Gly-Ser

Gly-Gly-Ser

Ser-Gly-Gly  
Gly-Gly-Gly-Ser  
Ser-Gly-Gly-Gly  
Gly-Gly-Gly-Gly-Ser  
Ser-Gly-Gly-Gly-Gly  
Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser  
Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly  
Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser  
Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly  
(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub> 以及  
(Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>n</sub>

其中 n 是不小于 1 的整数。肽接头长度在 1-15 个氨基酸范围内, 优选 2-12 个氨基酸, 更优选 3-10 个氨基酸。在重建多肽编码 DNA 的说明部分或本发明中, 描述了引入这些接头的方法。

根据本发明, 化学合成的接头, 即化学交联剂, 可以是常规用于连接肽的任何接头。接头的例子包括 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、辛二酸二琥珀酰亚胺酯 (DSS)、辛二酸双(磺基琥珀酰亚胺酯) (BS<sup>3</sup>)、二硫代双(丙酸琥珀酰亚胺酯) (DSP)、二硫代双(丙酸磺基琥珀酰亚胺酯) (DTSSP)、乙二醇双(琥珀酸琥珀酰亚胺酯) (EGS)、乙二醇双(琥珀酸磺基琥珀酰亚胺酯) (sulfo-EGS)、酒石酸二琥珀酰亚胺酯 (DST)、酒石酸二磺基琥珀酰亚胺酯 (sulfo-DST)、双[2-(琥珀酰亚胺基氧羰基氧基) 乙基]砒 (BSOCOES)、双[2-(磺基琥珀酰亚胺基氧羰基氧基) 乙基]砒 (sulfo-BSOCOES) 等。这些都是商品化的。

为形成单链 Fv 的二聚体, 优选接头适于在溶液中, 例如培养基中使宿主细胞产生的单链 Fv 二聚体化超过 20%, 优选地超过 50%, 更优选地超过 80%, 最优选地超过 90%。特别地, 优选接头由 2-12 个氨基酸组成, 优选地 3-10 个氨基酸, 或其它相应接头。

#### 重建多肽的制备

通过用上述接头连接源于抗人 IAP 的单克隆抗体的 H 链 V 区和 L

链 V 区, 可获得可与具有人 IAP 的细胞结合的重建多肽。单链 Fv 的例子有 MABL1-scFv, 其包含源于抗体 MABL-1 的 H 链 V 区和 L 链 V 区, 以及 MABL2-scFv, 其包含源于抗体 MABL-2 的 H 链 V 区和 L 链 V 区。

为制备重建多肽, 如果希望多肽是分泌肽, 则可在多肽 N 端连接信号肽。为有效纯化多肽, 可以连接众所周知的用于多肽纯化的氨基酸序列, 例如 FLAG 序列。用抗 FLAG 抗体可以有效地纯化该多肽。

为制备本发明重建多肽, 必须获得重建多肽的编码 DNA, 即单链 Fv 的编码 DNA 或者重建多肽单体的编码 DNA。这些 DNA 可由 MABL1-scFv 和/或 MABL2-scFv 的 H 链 V 区和 L 链 V 区的编码 DNA 获得。利用 DNA 为模板, 以及对应其两末端的引物对, PCR 扩增上述序列中目的氨基酸序列的编码 DNA, 也可以获得这些 DNA。

当希望每个 V 区的氨基酸序列部分改变时, 可使用本领域已知的 PCR 方法, 获得其中一个或一些氨基酸改变的 V 区, 即缺失、替换或增加。为制备对特定抗原具有充分活性的重建多肽, 优选地利用本领域已知的 PCR 方法, 改变 V 区中的部分氨基酸序列。

为确定 PCR 扩增的引物, 必须决定抗体 MABL-1 和/或抗体 MABL-2 的 H 链和 L 链的类型。然而已有报道, 抗体 MABL-1 为  $\kappa$  型 L 链和  $\gamma$ 1 型 H 链, 抗体 MABL-2 为  $\kappa$  型 L 链和  $\gamma$ 2a 型 H 链 (JP-App1. 11-63557)。为 PCR 扩增抗体 MABL-1 和/或抗体 MABL-2 的 H 链和 L 链的编码 DNA, 可以使用 Jones, S. T. 等人, Bio/Technology, 9, 88-89, 1991 所述引物。

为使用聚合酶链反应 (PCR) 方法扩增抗体 MABL-1 和抗体 MABL-2 的 L 链 V 区, 按上述方法确定 5'端和 3'端的寡核苷酸引物。以同样方法确定扩增抗体 MABL-1 和抗体 MABL-2 的 H 链 V 区所用的 5'端和 3'端寡核苷酸引物。

本发明的实施方案中, 使用的 5'端引物包含 "GATC" 序列, 以在邻近其 5'端提供限制性酶 Hinf I 消化位点, 3'端引物包含核苷酸序列 "CCCGGG", 以在邻近其 5'端提供 XmaI 消化位点。只要可用于将目的 DNA 片段亚克隆到克隆载体中, 即可以使用这些位点以外的其它限制

性酶消化位点。

使用特别设计的 PCR 引物，在抗体 MABL-1 和 MABL-2 的 V 区编码 cDNA 的 5'端和 3'端提供合适的核苷酸序列，从而使 cDNA 容易插入表达载体并在表达载体中行使适当的功能（例如，本发明设计通过插入 Kozak 序列提高转录效率）。利用这些引物进行 PCR 扩增，获得抗体 MABL-1 和 MABL-2 的 V 区，将其插入包含人目的 C 区的 HEF 表达载体（WO92/19759）。可利用任何常规方法对克隆的 DNA 测序，例如包括将 DNA 插入合适的载体，然后用自动 DNA 测序仪进行测序（Applied Biosystems）。

可按下列方法，将一接头，例如肽接头引入本发明的重建多肽。设计具有上述 H 链 V 区和 L 链 V 区引物的部分互补序列，并编码接头的 N 端或 C 端的引物。然后，利用这些引物进行 PCR，制备具有目的氨基酸序列及长度的肽接头的编码 DNA。利用得到的 DNA 连接 H 链 V 区和 L 链 V 区的编码 DNA，制备本发明具有目的肽接头的重建多肽的编码 DNA。一旦制备了一个重建多肽的编码 DNA，即通过设计接头的各种引物，利用引物以及上述 DNA 为模板进行 PCR，可以很容易制备有或没有目的肽接头的重建多肽的编码 DNA。

利用常规技术，能够对本发明重建多肽的每个 V 区进行人源化（例如，Sato K. 等人，Cancer Res., 53, 851-856（1993））。一旦制备了人源化 Fv 的编码 DNA，可很容易按照常规方法，制备人源化单链 Fv、人源化单链 Fv 的片段、人源化单克隆抗体以及人源化单克隆抗体的片段。优选地，如果需要，可以对其 V 区氨基酸序列进行部分改变。

此外，利用上述制备源于小鼠的 H 链 V 区和 L 链 V 区编码 DNA 的同样方法，可以制备源于其它哺乳动物的 DNA，例如人的 DNA。得到的 DNA 可用于制备其它哺乳动物特别是人的 H 链 V 区和 L 链 V 区、源于人的单链 Fv 及其片段、以及人源单克隆抗体及其片段。

如上所述，一旦制备了重建多肽的 V 区以及重建人源化多肽的 V 区的目的编码 DNA，就可以按照常规方法获得包含它们的表达载体以及用载体转化的宿主。此外，可按照常规方法培养宿主，以制备重建

单链 Fv、重建人源化单链 Fv、人源化单克隆抗体及其片段。可从细胞或培养基中分离它们，并纯化为均一物质。为此目的，如果需要，可以联合使用用于蛋白质分离和纯化的任何常规方法，例如，但不局限于，层析、超滤、盐析和透析。

当在无血清培养基中培养动物细胞，例如 COS7 细胞或 CHO 细胞，优选 CHO 细胞，制备本发明的重建单链 Fv 时，该重建的单链 Fv 可有效地在培养基中二聚体化。可以稳定并有效地分离上述形成的单链 Fv 二聚体，并以二聚体形式长期保存。本发明使用的无血清培养基，可以是常规用于制备重组蛋白质的任何培养基，但并不局限于此。

为制备本发明可与具有人 IAP 的细胞结合的重建多肽，可以利用任何表达系统，例如，真核细胞如动物细胞，例如建立的哺乳动物细胞系、丝状真菌和酵母，以及原核细胞如细菌细胞，例如 *E. coli*。优选地，在哺乳动物细胞中表达本发明的重建多肽，例如 COS7 细胞或 CHO 细胞。

在这些情况下，可使用可用于哺乳动物细胞表达的常规启动子。优选使用人巨细胞病毒 (HCMV) 的立即早期启动子。包含 HCMV 启动子的表达载体，包括 HCMV-VH-HC $\gamma$ 1、HCMV-VL-HCK 以及源于 pSV2neo 的启动子等 (W092/19759)。

此外，本发明可使用的可用于哺乳动物细胞基因表达的其它启动子，包括来源于逆转录病毒、多形瘤病毒、腺病毒和猿猴病毒 40 (SV40) 的病毒启动子，以及来源于哺乳动物的启动子，例如人多肽链延长因子 1 $\alpha$  (HEF-1 $\alpha$ )。根据 Mulligan R.C. 等人的方法可容易使用 SV40 启动子 (Nature 277, 108-114 (1979))，也可根据 Mizushima S. 等人方法使用 HEF-1 $\alpha$  启动子 (Nucleic Acids Research, 18, 5322 (1990))。

可用于本发明的复制起点 (ori)，包括来源于 SV40、多形瘤病毒、腺病毒、牛乳头瘤病毒 (BPV) 等的起点。为了在宿主细胞系统扩增基因拷贝数等目的，表达载体可包含磷酸转移酶 APH (3') II 或 I (neo) 基因、胸苷激酶 (TK) 基因、*E. coli* 黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核

糖转移酶 (Ecogpt) 基因或二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因作为选择标志。

以小鼠抗体 MABL-1 和 MABL-2 对人 IAP 的结合-抑制能力为指标, 可评价上述制备的重建多肽的抗原结合活性。具体地, 以小鼠抗体 MABL-2 与人 IAP 抗原的结合是否存在浓度依赖性抑制作用为指标, 评价其活性。

更详细地, 培养用本发明包含重建多肽编码 DNA 的表达载体转化的动物细胞, 例如 COS7 细胞或 CHO 细胞。培养的细胞和/或培养上清、或从中纯化的重建多肽, 用于测定与抗原的结合。只转化表达载体的细胞的培养上清, 用作对照。将本发明重建多肽的测试样品或对照上清加入小鼠白血病 L1210 细胞系, L1210 细胞表达人整合素相关蛋白质 (IAP), 然后进行测定, 例如流式细胞术, 以评价抗原结合活性。

用以下方法评价体外的凋亡诱导效应: 将上述重建多肽的测试样品加入转有人 IAP 基因的细胞中, 评价其诱导人 IAP 特异性细胞死亡的能力。

用以下方法评价体内的凋亡诱导效应: 制备人骨髓瘤的小鼠模型。对小鼠静脉内给予单克隆抗体或本发明的重建多肽, 诱导具有 IAP 的有核血细胞凋亡。对照组小鼠只给予 PBS。基于小鼠血清中人 IgG 含量及其存活时间的变化, 根据抗肿瘤效应评价其凋亡诱导作用。

用以下方法测试血细胞凝集效应: 从健康供者血液制备红细胞悬液。悬液中加入不同浓度的测试样品, 然后温育, 以测定血细胞凝集反应。

本发明包含二个或多个 H 链 V 区以及二个或多个 L 链 V 区的重建多肽, 可以是包含一个 H 链 V 区和一个 L 链 V 区的单链 Fv 的二聚体、三聚体或四聚体, 或者是其中有二个或多个 H 链 V 区和二个或多个 L 链 V 区相连的多肽。可以认为, 由于这样的构造, 使肽模拟亲本单克隆抗体抗原结合位点的三维结构, 从而保持优良的抗原结合特性。

本发明多肽相比于所有 IgG, 对组织或肿瘤的灵活性强, 而血细胞凝集反应的副作用显著降低或消失。因此, 期望本发明的肽可用作

血液病的治疗剂，例如白血病，如急性髓细胞性白血病、慢性骨髓性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性成淋巴细胞性白血病、成人T细胞白血病、多发性骨髓瘤、混合型白血病和毛细胞白血病、恶性淋巴瘤（何杰金氏病、非何杰金氏淋巴瘤）、再生障碍性贫血、骨髓发育不良综合症以及真性红细胞增多症。还期望本发明的肽经过RI标记后可用作造影试剂。通过连接RI化合物或毒素，可增强肽的效果。

### 本发明的最佳工作方式

本发明将根据以下实施例具体阐明，但并不限制本发明的范围。

为阐明本发明重建多肽的制备方法，如下所示制备单链Fv的实施例。制备重建多肽的实施例中使用了小鼠抗人IAP抗体，MABL-1和MABL-2。1997年9月11日，将产生这两个抗体的杂交瘤MABL-1和MABL-2，国际上分别以FERM BP-6100和FERM BP-6101存放于微生物保藏机构——国立生命科学和人体技术研究所，国际贸易和工业部（National Institute of Bioscience and human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Minister of International Trade and Industry）（1-3 Higasi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-Ken, Japan）。

### 实施例1（克隆小鼠抗人IAP单克隆抗体V区的编码DNA）

如下克隆小鼠抗人IAP单克隆抗体MABL-1和MABL-2的可变区的编码DNA。

#### 1.1 制备信使RNA (mRNA)

利用mRNA Purification试剂盒（Pharmacia Biotech）获得杂交瘤MABL-1和MABL-2的mRNA。

#### 1.2 合成双链cDNA

利用Marathon cDNA Amplification试剂盒（CLONTECH）从1  $\mu$ g mRNA合成双链cDNA，并连上一个接头。

#### 1.3 PCR扩增抗体可变区的编码基因

利用Thermal Cycle（PERKIN ELMER）进行PCR。

### (1) 扩增 MABL-1 L 链 V 区编码基因

用于 PCR 方法的引物是 SEQ ID No. 1 所示 Adapter 引物-1, (CLONTECH), 它与接头的部分序列杂交, 以及 SEQ ID No. 2 所示 MKC (鼠 Kappa 恒定) 引物 (Bio/Technology, 9, 88-89, 1991), 它与小鼠 Kappa 型 L 链 V 区杂交。

50 $\mu$ l PCR 溶液包含 5 $\mu$ l 10  $\times$ PCR 缓冲液 II、2mM MgCl<sub>2</sub>、0.16mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP 和 dTTP)、2.5 单位 DNA 聚合酶 AmpliTaq Gold (PERKIN ELMER)、0.2 $\mu$ M SEQ ID No. 1 接头引物、0.2 $\mu$ M SEQ ID No. 2 MKC 引物以及 0.1 $\mu$ g 来源于 MABL-1 的双链 cDNA。溶液于起始温度 94 $^{\circ}$ C 预热 9 分钟, 然后依次 94 $^{\circ}$ C 加热 1 分钟、60 $^{\circ}$ C 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 1 分 20 秒。此温度循环重复 35 次, 然后 72 $^{\circ}$ C 再加热反应混合物 10 分钟。

### (2) 扩增 MABL-1 H 链 V 区的编码 cDNA

SEQ ID No. 1 所示 Adapter 引物-1 以及 SEQ ID No. 3 所示 MHC- $\gamma$ 1 (小鼠重链恒定) 引物 (Bio/Technology, 9, 88-89, 1991) 用作 PCR 引物。

按照实施例 1.3-(1) 所述 L 链 V 区基因的扩增方法进行 cDNA 扩增, 只是使用 0.2 $\mu$ M MHC- $\gamma$ 1 引物, 而非 0.2 $\mu$ M MKC 引物。

### (3) 扩增 MABL-2 L 链 V 区的编码 cDNA

SEQ ID No. 1 的 Adapter 引物-1 以及 SEQ ID No. 2 的 MKC 引物用作 PCR 引物。

按照实施例 1.3-(1) 所述 MABL-1 L 链 V 区基因的扩增方法进行 cDNA 扩增, 只是使用 0.1 $\mu$ g 来源于 MABL-2 的双链 cDNA, 而非 0.1 $\mu$ g MABL-1 的双链 cDNA。

### (4) 扩增 MABL-2 H 链 V 区的编码 cDNA

SEQ ID No. 1 的 Adapter 引物-1 以及 SEQ ID No. 4 所示 MHC- $\gamma$ 2a 引物 (Bio/Technology, 9, 88-89, 1991) 用作 PCR 引物。

按照实施例 1.3-(3) 所述 L 链 V 区基因扩增方法进行 cDNA 扩增, 只是使用 0.2 $\mu$ M MHC- $\gamma$ 2a 引物, 而非 0.2 $\mu$ M MKC 引物。

#### 1.4 纯化 PCR 产物

利用 QIAquick PCR Purification 试剂盒 (QIAGEN) 纯化上述 PCR 扩增的 DNA 片段, 并溶于含 1mM EDTA 的 10mM Tris-HCl (pH8.0)。

#### 1.5 连接和转化

上述制备的包含源于小鼠 MABL-1 Kappa 型 L 链 V 区编码基因的 DNA 片段约 140ng, 与 50ng pGEM-T Easy 载体 (Promega) 于 15℃ 连接 3 小时, 反应缓冲液包含 30mM Tris-HCl (pH7.8)、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mM 二硫苏糖醇、1mM ATP 以及 3 单位 T4 DNA 连接酶 (Promega)。

然后将 1μl 反应混合物加入 50μl *E. Coli* DH5α 感受态细胞中 (Toyobo Inc.), 细胞于冰上保存 30 分钟, 42℃ 温育 1 分钟, 冰上再保存 2 分钟。加入 100μl SOC 培养基 (GIBCO BRL)。将 *E. coli* 细胞接种在含 100μg/ml 氨苄青霉素 (SIGMA) 的 LB 琼脂培养基中 (Molecular Cloning: A laboratory Manual, Sambrook 等人, Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989), 37℃ 培养过夜, 获得 *E. coli* 转化子。

转化子在 3ml 含有 50μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37℃ 培养过夜, 使用 QIAprep Spin Minprep 试剂盒 (QIAGEN) 从培养物中制备质粒 DNA。

所得包含源于杂交瘤 MABL-1 的小鼠 Kappa 型 L 链 V 区的编码基因的质粒, 命名为 pGEM-M1L。

按照上述相同的方法, 从纯化的 DNA 片段中制备质粒, 其包含源于杂交瘤 MABL-1 的小鼠 H 链 V 区编码基因, 命名为 pGEM-M1H。

从纯化的 DNA 片段中制备质粒, 其包含源于杂交瘤 MABL-2 的小鼠 Kappa 型 L 链 V 区编码基因, 命名为 pGEM-M2L。

从纯化的 DNA 片段中制备质粒, 其包含源于杂交瘤 MABL-2 的小鼠 H 链 V 区编码基因, 命名为 pGEM-M2H。

#### 实施例 2 (DNA 测序)

利用 Auto DNA Sequencer (Applied Biosystem) 和 ABI PRISM Dye

Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction 试剂盒 (Applied Biosystem), 按照制造商规程, 测定上述质粒中 cDNA 编码区的核苷酸序列。

质粒 pGEM-M1L 中包含小鼠抗体 MABL-1 的 L 链 V 区编码基因, 其核苷酸序列如 SEQ ID No. 5 所示。

质粒 pGEM-M1H 中包含小鼠抗体 MABL-1 的 H 链 V 区编码基因, 其核苷酸序列如 SEQ ID No. 6 所示。

质粒 pGEM-M2L 中包含小鼠抗体 MABL-2 的 L 链 V 区编码基因, 其核苷酸序列如 SEQ ID No. 7 所示。

质粒 pGEM-M2H 中包含小鼠抗体 MABL-2 的 H 链 V 区编码基因, 其核苷酸序列如 SEQ ID No. 8 所示。

### 实施例 3 (确定 CDR)

L 链与 H 链的 V 区通常结构相似, 其每四个框架区通过三个高度可变区, 即互补性决定区 (CDR) 相连。框架的氨基酸序列相对很保守, 而 CDR 的氨基酸序列极其高度可变 (Kabat E. A. 等人, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Dept. Health and Human Services, 1983)。

基于这些事实, 将小鼠抗人 IAP 单克隆抗体的可变区氨基酸序列, 进入 Kabat 等人建立的抗体氨基酸序列数据库中, 检索其同源性。表 1 所示为根据同源性确定的 CDR 区。

表 1

| 质粒       | SEQ ID No. | CDR(1) | CDR(2) | CDR(3)  |
|----------|------------|--------|--------|---------|
| pGEM-M1L | 5          | 43-58  | 74-80  | 113-121 |
| pGEM-M1H | 6          | 50-54  | 69-85  | 118-125 |
| pGEM-M2L | 7          | 43-58  | 74-80  | 113-121 |
| pGEM-M2H | 8          | 50-54  | 69-85  | 118-125 |

实施例 4(鉴定克隆 cDNA 的表达、制备嵌合 MABL-1 抗体和嵌合 MABL-2 抗体)

#### 4.1 制备表达嵌合 MABL-1 抗体的载体

分别编码小鼠抗体 MABL-1 的 L 链与 H 链 V 区的 cDNA 克隆 pGEM-M1L 和 pGEM-M1H, 经过 PCR 方法改变后, 引入 HEF 表达载体(WO92/19759), 制备嵌合 MABL-1 抗体的表达载体。

设计 L 链 V 区的正向引物 MLS (SEQ ID No. 9) 和 H 链 V 区的正向引物 MHS (SEQ ID No. 10), 使之可与每个 V 区前导序列开始处的编码 DNA 杂交, 并包含 Kozak 共有序列(J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987) 以及 HindIII 限制性酶位点。设计 L 链 V 区反向引物 MLAS (SEQ ID No. 11) 和 H 链 V 区反向引物 MHAS (SEQ ID No. 12), 使之可与 J 区末端编码 DNA 杂交, 并包含剪接供体序列以及 BamHI 限制性酶位点。

将包含 10 $\mu$ l 10 $\times$ PCR 缓冲液 II、2mM MgCl<sub>2</sub>、0.16mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP 和 dTTP)、5 单位 DNA 聚合酶 AmpliTaq Gold、0.4 $\mu$ M 每种引物和 8ng 模板 DNA (pGEM-M1L 或 pGEM-M1H) 的 100 $\mu$ l PCR 溶液, 在起始温度 94 $^{\circ}$ C 预热 9 分钟, 然后依次 94 $^{\circ}$ C 加热 1 分钟、60 $^{\circ}$ C 1 分钟、72 $^{\circ}$ C 1 分 20 秒。此温度循环重复 35 次, 72 $^{\circ}$ C 再加热反应混合物 10 分钟。

用 QIAquick PCR Purification 试剂盒 (QIAGEN) 纯化 PCR 产物, 然后用 HindIII 和 BamHI 消化。L 链 V 区的产物克隆到 HEF 表达载体 HEF- $\kappa$  中, 将 H 链 V 区的产物克隆到 HEF 表达载体 HEF- $\gamma$  中。DNA 测序后, 包含正确序列 DNA 片段的质粒, 分别命名为 HEF-M1L 和 HEF-M1H。

#### 4.2 制备表达嵌合 MABL-2 抗体的载体

按照如实施例 4.1 所述相同的方法, 对 cDNA 进行改变和克隆, 只是使用 pGEM-M2L 和 pGEM-M2H 为模板 DNA, 而非 pGEM-M1L 和 pGEM-M1H。DNA 测序后, 含有正确序列 DNA 片段的质粒, 分别命名为 HEF-M2L 和 HEF-M2H。

#### 4.3 转染 COS7 细胞

在 COS7 细胞中测试上述表达载体，观察嵌合 MABL-1 和 MABL-2 抗体的瞬时表达。

#### (1) 转染嵌合 MABL-1 抗体的基因

使用 Gene Pulser 装置 (BioRad)，通过电穿孔将 HEF-M1L 和 HEF-M1H 载体共转化 COS7 细胞。小杯中加入每种 DNA (10 $\mu$ g) 和 0.8ml 含  $1 \times 10^7$  细胞/ml 的 PBS。混合物用 1.5KV 脉冲、25 $\mu$ F 电容处理。

室温恢复 10 分钟后，将电穿孔细胞转到包含 10% 无  $\gamma$ -球蛋白的胎牛血清的 DMFM 培养基中 (GIBCO BRL)。培养 72 小时后，收集上清，离心去除细胞碎片并回收。

#### (2) 转染嵌合 MABL-2 抗体的基因

利用如实施例 4.3-(1) 所述相同方法，将嵌合 MABL-2 抗体的编码基因共转染 COS7 细胞，只是使用 HEF-M2L 和 HEF-M2H 载体，而非 HEF-M1L 和 HEF-M1H 载体。以同样方法回收上清。

### 4.4 流式细胞术

利用上述 COS7 细胞培养上清进行流式细胞术分析，测量其抗原结合。将表达嵌合 MABL-1 抗体的 COS7 细胞或表达嵌合 MABL-2 抗体的 COS7 的细胞的培养上清或者作对照的人 IgG 抗体 (SIGMA)，加入  $4 \times 10^5$  表达人 IAP 的小鼠白血病细胞系 L1210 细胞中，冰浴。洗涤后，向其中加入 FITC 标记的抗人 IgG 抗体 (Cappel)。温育并洗涤后，用 FACScan 装置 (BECTON DICKINSON) 测量其荧光强度。

由于嵌合 MABL-1 和 MABL-2 抗体特异性结合表达人 IAP 的 L1210 细胞，可以确认，这些嵌合抗体分别具有小鼠单克隆抗体 MABL-1 和 MABL-2 的正确 V 区结构 (附图 1-3)。

### 实施例 5 (制备抗体 MABL-1 和抗体 MABL-2 的重建单链 Fv (scFv))

#### 5.1 制备抗体 MABL-1 的重建单链 Fv

如下制备抗体 MABL-1 的重建单链 Fv。利用 PCR 方法分别扩增抗体 MABL-1 的 H 链 V 区和 L 链 V 区，以及接头，并连接在一起，以制备抗体 MABL-1 的重建单链 Fv。制备方法如图 4 所示。利用六种引物 (A-E)

制备抗体 MABL-1 的单链 Fv。引物 A、C 和 E 具有正义序列，引物 B、D 和 F 具有反义序列。

H 链 V 区的正向引物 VHS（引物 A，SEQ ID No. 13）设计为可与 H 链 V 区 N 端编码 DNA 杂交，并包含 NcoI 限制性酶识别位点。H 链 V 区的反向引物 VHAS（引物 B，SEQ ID No. 14）设计为可与 H 链 V 区 C 端编码 DNA 杂交，并与接头重叠。

接头的正向引物 LS（引物 C，SEQ ID No. 15）设计为可与接头 N 端编码 DNA 杂交，并与 H 链 V 区 C 端编码 DNA 重叠。接头的反向引物 LAS（引物 D，SEQ ID No. 16）设计为可与接头 C 端编码 DNA 杂交，并与 L 链 V 区 N 端编码 DNA 重叠。

L 链 V 区的正向引物 VLS（引物 E，SEQ ID No. 17）设计为可与接头 C 端编码 DNA 杂交，并与 L 链 V 区 N 端编码 DNA 重叠。L 链 V 区的反向引物 VLAS-FLAG（引物 F，SEQ ID No. 18）设计为可与 L 链 V 区 C 端编码 DNA 杂交，并具有 FLAG 肽编码序列（Hopp T.P. 等人，Bio/Technology, 6, 1204-1210, 1988）、两个终止密码子以及 EcoRI 限制性酶识别位点。

在第一个 PCR 步骤中，进行 A-B、C-D、E-F 三个反应，纯化其 PCR 产物。将第一步 PCR 获得的三种 PCR 产物按照其互补性进行组装。然后加入引物 A 和 F，扩增抗体 MABL-1 的重建单链 Fv 的全长编码 DNA（第二步 PCR）。第一步 PCR 中分别用作模板的质粒包括，编码抗体 MABL-1 H 链 V 区的质粒 pGEM-M1H（参见实施例 2），包含接头区编码 DNA 序列的质粒 pSC-DP1（该接头区包含：Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser（SEQ ID No. 19））（Huston J.S. 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5879-5883, 1988），以及编码抗体 MABL-1 L 链 V 区的质粒 pGEM-M1L（参见实施例 2）。

第一步 PCR 反应的 50 $\mu$ l 溶液包含 5 $\mu$ l 10  $\times$ PCR 缓冲液 II、2mM MgCl<sub>2</sub>、0.16mM dNTPs、2.5 单位 DNA 聚合酶 AmpliTaq Gold（PERKIN ELMER）、0.4 $\mu$ M 每种引物和 5ng 每种模板 DNA。PCR 溶液在起始温度 94 $^{\circ}$ C 预热 9 分钟，然后依次 94 $^{\circ}$ C 加热 1 分钟、65 $^{\circ}$ C 1 分钟、72 $^{\circ}$ C 1

分 20 秒。此温度循环重复 35 次，然后 72℃ 再加热反应混合物 7 分钟。

利用 QIApuick PCR Purification 试剂盒 (QIAGEN) 纯化 PCR 产物 A-B (371bp)、C-D (63bp) 和 E-F (384bp)，并在第二步 PCR 中组装。第二步 PCR 中，将包含 120ng 第一步 PCR 产物 A-B、20ng PCR 产物 C-D 和 120ng PCR 产物 E-F、10 $\mu$ l 10 ×PCR 缓冲液 II、2mM MgCl<sub>2</sub>、0.16mM dNTPs、5 单位 DNA 聚合酶 AmpliTaq Gold (PERKIN ELMER) 的 98 $\mu$ l PCR 溶液，在起始温度 94℃ 预热 8 分钟，然后依次 94℃ 加热 2 分钟、65℃ 2 分钟、72℃ 2 分钟。此温度循环重复 2 次，然后反应中分别加入每种引物 A 和 F 0.4 $\mu$ M。混合物在起始温度 94℃ 预热 1 分钟，然后依次 94℃ 加热 1 分钟、65℃ 1 分钟、72℃ 1 分 20 秒。此温度循环重复 35 次，然后 72℃ 再加热反应混合物 7 分钟。

纯化第二步 PCR 制备的 843bp DNA 片段，用 NcoI 和 EcoRI 消化。将得到的 DNA 片段克隆到 pSCFVT7 载体。表达载体 pSCFVT7 包含适于 *E. coli* 周质表达系统的 pelB 信号序列 (Lei S.P. 等人, J. Bacteriology, 169, 4379-4383, 1987)。DNA 测序后，将包含抗体 MABL-1 的重建单链 Fv 正确氨基酸序列的编码 DNA 片段的质粒，命名为“pscM1” (参见图 5)。质粒 pscM1 中包含抗体 MABL-1 重建单链 Fv 的核苷酸序列和氨基酸序列，如 SEQ ID No. 20 所示。

利用 PCR 方法改变 pscM1 载体，以制备在哺乳动物细胞中表达抗体 MABL-1 重建单链 Fv 的载体。将得到的 DNA 片段引入 pCHO1 表达载体。表达载体 pCHO1 是经过 EcoRI 和 SmaI 消化 DHFR- $\Delta$ E-rvH-PM1-f (W092/19759)，去除抗体基因，并连上 EcoRI-NotI-BamHI 接头 (Takara Shuzo) 而构建的。

设计 SEQ ID No. 21 所示 Sal-VHS 引物，作为 PCR 正向引物，其可与 H 链 V 区 N 端的编码 DNA 杂交，并包含 Sal I 限制性酶识别位点。设计如 SEQ ID No. 22 所示 FRH1anti 引物，作为 PCR 反向引物，其可与第一框架序列末端的编码 DNA 杂交。

将包含 10 $\mu$ l 10×PCR 缓冲液 II、2mM MgCl<sub>2</sub>、0.16mM dNTPs、5 单位 DNA 聚合酶 AmpliTaq Gold、0.4 $\mu$ l 每种引物以

及 8ng 模板 DNA (pscM1) 的 100 $\mu$ l PCR 溶液, 在起始温度 95 $^{\circ}$ C 预热 9 分钟, 然后依次 95 $^{\circ}$ C 加热 1 分钟、60 $^{\circ}$ C 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 1 分 20 秒。重复此温度循环 35 次, 然后 72 $^{\circ}$ C 再加热反应混合物 7 分钟。

利用 QIAquick PCR Purification 试剂盒 (QIAGEN) 纯化 PCR 产物, 用 SalI 和 MboII 消化, 获得抗体 MABL-1 的重建单链 Fv 的 N 端编码 DNA 片段。用 MboII 和 EcoRI 消化 pscM1 载体, 获得抗体 MABL-1 的重建单链 Fv C 的端编码 DNA 片段。将该 SalI-MboII DNA 片段和 MboII-EcoRI DNA 片段克隆到 pCHO1-IgS 载体。DNA 测序后, 将包含目的 DNA 序列的质粒命名为“pCHOM1”(参见图 6)。表达载体 pCHO1-IgS 包含适于哺乳动物细胞分泌表达系统的小鼠 IgG1 信号序列 (Nature, 322, 323-327, 1988)。质粒 pCHOM1 包含的抗体 MABL-1 重建单链 Fv 的核苷酸序列和氨基酸序列如 SEQ ID No. 23 所示。

## 5.2 制备抗体 MABL-2 的重建单链 Fv

按照上述实施例 5.1 方法, 制备抗体 MABL-2 的重建单链 Fv。第一步 PCR 中利用编码 MABL-2 的 H 链 V 区的质粒 pGEM-M2H (参见实施例 2), 而非 pGEM-M1H, 以及编码 MABL-2 的 L 链 V 区的质粒 pGEM-M2L (参见实施例 2), 而非 pGEM-M1L, 从而获得质粒 pscM2, 其中包含的抗体 MABL-2 的单链 Fv 目的氨基酸序列的编码 DNA 片段。质粒 pscM2 中包含抗体 MABL-2 的重建单链 Fv, 其核苷酸序列和氨基酸序列如 SEQ ID No. 24 所示。

利用 PCR 方法改变 pscM2 载体, 制备载体 pCHOM2, 用于在哺乳动物细胞中表达, 其中包含抗体 MABL-2 的重建单链 Fv 正确氨基酸序列的编码 DNA 片段。质粒 pCHOM2 中包含的抗体 MABL-2 的重建单链 Fv, 其核苷酸序列和氨基酸序列如 SEQ ID No. 25 所示。

## 5.3 转染 COS7 细胞

在 COS7 细胞中测试 pCHOM2 载体, 观察抗体 MABL-2 的重建单链 Fv 的瞬时表达。

利用 Gene Pulser 装置 (BioRad), 通过电穿孔将 pCHOM2 转化 COS7 细胞。向小杯中加入 DNA (10 $\mu$ g) 以及 0.8ml 含  $1 \times 10^7$  细胞/ml

的 PBS。用 1.5KV 脉冲、25 $\mu$ F 电容脉冲处理混合物。

室温恢复 10 分钟后,将电穿孔细胞转到含有 10%胎牛血清的 IMDM 培养基中 (GIBCO BRL)。培养 72 小时后,收集上清,离心去除细胞碎片并回收。

#### 5.4 在 COS7 细胞培养上清中检测抗体 MABL-2 的重建单链 Fv

在经 pCHOM2 载体转染的 COS7 细胞的培养上清中,通过 Western 印迹方法确认抗体 MABL-2 的单链 Fv 的存在。

将经 pCHOM2 载体转染的 COS7 细胞的培养上清,以及作对照的经 pCHO1 转染的 COS7 细胞培养上清,进行 SDS 电泳,并转到 REINFORCED NC 膜上 (Schleicher & Schuell)。用 5%脱脂牛奶 (Morinaga Nyu-gyo) 封闭膜,用 0.05%Tween20-PBS 洗涤,与抗 FLAG 抗体混合 (SIGMA)。膜在室温下温育、洗涤并混合碱性磷酸酶偶联的小鼠 IgG 抗体 (Zymed)。室温下温育并洗涤后,加入底物液 (Kirkegaard Perry Laboratories) 显色 (图 7)。

只在引入 pCHOM2 载体的 COS7 细胞的培养上清中检测到 FLAG 肽特异性蛋白质,从而证明抗体 MABL-2 的重建单链 Fv 分泌到培养上清中。

#### 5.5 流式细胞术

利用上述 COS7 细胞培养上清,通过流式细胞术测定抗原结合。将表达抗体 MABL-2 的重建单链 Fv 的 COS7 细胞培养上清,或者作对照的经 pCHO1 载体转化的 COS7 细胞培养上清,加入  $2 \times 10^5$  个表达人整合素相关蛋白质 (IAP) 的小鼠白血病细胞系 L1210 细胞中,或者加入作对照的 pCOS1 转化的 L1210 细胞系的细胞中。冰浴并洗涤后,加入小鼠抗 FLAG 抗体 (SIGMA)。然后温育细胞并洗涤。之后向其中加入 FITC 标记的抗小鼠 IgG 抗体 (BECTON DICKINSON),温育细胞并再次洗涤。随后用 FACSscan 装置 (BECTON DICKINSON) 测量荧光强度。

由于抗体 MABL-2 的单链 Fv 与表达人 IAP 的 L1210 细胞特异性结合,故可以确定抗体 MABL-2 的重建单链 Fv 与人整合素相关蛋白质 (IAP) 具有亲和力 (参见图 8-11)。

#### 5.6 竞争性 ELISA

根据对小鼠单克隆抗体结合抗原的抑制活性,测定抗体 MABL-2 的重建单链 Fv 的结合活性。

将抗 FLAG 抗体调整为  $1\mu\text{g}/\text{ml}$ , 加入 96 孔板的每孔中,  $37^\circ\text{C}$  温育 2 小时。洗涤后, 用 1% BSA-PBS 封闭。室温下温育并洗涤后, 将引入了分泌型人 IAP 抗原基因 (SEQ ID No. 26) 的 COS7 细胞培养上清, 用 PBS 稀释到两倍体积, 加入每孔中。室温下温育并洗涤后, 将  $50\mu\text{l}$  调整为  $100\text{ng}/\text{ml}$  的生物素化 MABL-2 抗体与  $50\mu\text{l}$  顺序稀释的表达抗体 MABL-2 的重建单链 Fv 的 COS7 细胞培养上清的混合物, 加入每孔中。室温下温育并洗涤后, 每孔中加入碱性磷酸酶偶联的链亲合素 (Zymed)。室温下温育并洗涤后, 加入底物液 (SIGMA), 测量每孔中反应混合物在  $405\text{nm}$  处的吸光度。

结果表明, 以引入 pCH01 的 COS7 细胞培养上清作对照, 相比之下, 抗体 MABL-2 的重建单链 Fv (MABL2-scFv) 浓度依赖性地显著抑制小鼠抗体 MABL-2 与人 IAP 抗原的结合 (图 12)。因此提示, 抗体 MABL-2 的重建单链 Fv 中, 源于小鼠单克隆抗体 MABL-2 的每个 V 区的结构均正确。

### 5.7 体外凋亡诱导效应

使用人 IAP 基因转染的 L1210 细胞、作对照的经 pCOS1 载体转染的 L1210 细胞以及 CCRF-CEM 细胞, 通过 Annexin-V 染色 (Boehringer Mannheim), 检测抗体 MABL-2 的重建单链 Fv 的凋亡诱导作用。

在  $1 \times 10^5$  上述每种细胞中, 按 50% 终浓度加入表达抗体 MABL-2 的重建单链 Fv 的 COS7 细胞培养上清、或作对照的经 pCH01 载体转染的 COS7 细胞培养上清, 混合物培养 24 小时。然后进行 Annexin-V 染色, 用 FACSscan 装置 (BECTON DICKINSON) 测定荧光强度。

Annexin-V 的染色结果分别如图 13-18 所示。左下区的点代表活细胞, 右下区的点代表凋亡早期细胞, 右上区的点代表凋亡晚期细胞。结果显示, 抗体 MABL-2 的重建单链 Fv (MABL2-scFv) 诱导了特异性针对人 IAP 抗原的 L1210 细胞死亡 (图 13-16), 与对照相比, 重建的单链 Fv 也显著诱导 CCRF-CEM 细胞死亡 (图 17-18)。

### 5.8 在 CHO 细胞中表达源于 MABL-2 的单链 Fv

用 pCHOM2 载体转染 CHO 细胞，建立恒定表达源于抗体 MABL-2 的单链 Fv（多肽）的 CHO 细胞系。

使用 Gene Dulsers 装置（BioRad），通过电穿孔方法将 pCHOM2 载体转化 CHO 细胞。小杯中加入 DNA（10 $\mu$ g）和 0.7ml 含 CHO 细胞（1 $\times 10^7$  细胞/ml）的 PBS 的混合物。用 1.5KV、25 $\mu$ F 电容脉冲处理混合物。室温恢复 10 分钟后，将电穿孔细胞转到含 10%胎牛血清的无核酸  $\alpha$ -MEM 培养基（GIBCO BRL）中培养。得到的克隆用 SDS-PAGE 确认目的蛋白质的表达，选择表达水平高的克隆，作为源于抗体 MABL-2 的单链 Fv 的生产细胞系。在含有 10nM 氨甲蝶呤（SIGMA）的无血清培养基 CHO-S-SFM II（GIBCO BRL）中培养该细胞系。然后，收集培养上清，离心去除细胞碎片并回收。

### 5.9 纯化 CHO 细胞中产生的源于 MABL-2 的单链 Fv

将实施例 5.8 中获得的表达单链 Fv 的 CHO 细胞系的培养上清，利用人工透析柱（PAN130SF, ASAHI MEDICALS）多达浓缩 20 倍。浓缩液 -20 $^{\circ}$ C 保存，并于纯化时融化。

利用三种层析方法，即 Blue-sepharose、羟基磷灰石和凝胶过滤，从 CHO 细胞培养上清中纯化单链 Fv。

#### （1）Blue-sepharose 柱层析

用 20mM 乙酸盐缓冲液（pH6.0）稀释浓缩的上清 10 倍，离心去除不溶物（10000  $\times$  转/分，30 分钟）。用相同缓冲液平衡 Blue-sepharose 柱（20ml），将上清上样。用相同缓冲液洗柱后，利用相同缓冲液中的 NaCl 逐步梯度 0.1、0.2、0.3、0.5 到高达 1.0M，洗脱柱中吸附的蛋白质。用 SDS-PAGE 分析流过组分和每个洗脱组分。将确认含有单链 Fv 的组分（0.1-0.3M NaCl 洗脱组分）混合在一起，利用 Centri Prep-10（AMICON）浓缩高达大约 20 倍。

#### （2）羟基磷灰石

（1）中获得的浓缩液用 10mM 磷酸盐缓冲液（pH7.0）稀释 10 倍，上样羟基磷灰石柱（20ml, BIORAD）。用 60ml 10mM 磷酸盐缓冲液

(pH7.0)洗柱。然后,用高达200mM的磷酸钠缓冲液的线性梯度,洗脱柱中吸附的蛋白质(参见图19)。用SDS-PAGE分析每个组分,确认在组分A和组分B中存在单链Fv。

### (3) 凝胶过滤

用CentriPrep-10分别浓缩(2)中组分A和B,并上样到用含0.15M NaCl的20mM乙酸盐缓冲液(pH6.0)平衡的TSKgel G3000SWG柱(21.5×600mm)。层析图如图20所示。经SDS-PAGE分析各组分,确认了两个主峰(AI和BI)是目的单链Fv。凝胶过滤分析中,组分A在36kDa表观分子量处洗脱,组分B在76kDa处洗脱。用15% SDS聚丙烯酰胺凝胶分析纯化的单链Fv(AI、BI)。在有或无还原剂存在下处理样品,按照Laemmli's方法进行电泳。然后用考马斯亮蓝染色蛋白质。如图21所示,无论还原剂存在与否,AI和BI都呈现35kDa表观分子量处的单链。从上所述可以推断,AI是单链Fv的单体,BI是单链Fv非共价结合的二聚体。使用TSKgel G3000SW柱(7.5×60mm)通过凝胶过滤分析组分AI和BI,表明只在组分AI中检测到单体峰,只在组分BI中检测到二聚体峰(图22)。二聚体组分(组分BI)占总单链Fv的百分之四。二聚体组分中超过90%的二聚体可4℃稳定保存超过1个月。

### 5.10 构建在E. Coli细胞中表达源于抗体MABL-2的单链Fv的载体

利用PCR方法改变pscM2载体,以制备在E. coli中有效表达抗体MABL-2的单链Fv的载体。将得到的DNA片段引入pSCFVT7表达载体。

设计如SEQ ID No. 27所示Nde-VHSm02引物,作为PCR正向引物,其可与H链V区N端编码DNA杂交,并包含起始密码子和NdeI限制性酶识别位点。设计如SEQ ID No. 28所示VLAS引物,作为PCR反向引物,其可与L链V区C端编码DNA杂交,并包含二个终止密码子和EcoRI限制性酶识别位点。为在E. coli中有效表达,在正向引物Nde-VHSm02中与H链V区N端编码DNA可杂交的部分中包含5个点突变。

将包含 10 $\mu$ l 10 $\times$ PCR 缓冲液#1、1mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM dNTPs、5 单位 KOD DNA 聚合酶(都来自 TOYOBO)、1 $\mu$ M 每种引物和 100ng 模板 DNA (pscM2) 的 100 $\mu$ l PCR 溶液, 依次 98 $^{\circ}$ C 加热 15 秒、65 $^{\circ}$ C 2 秒以及 74 $^{\circ}$ C 30 秒。重复此温度循环 25 次。

利用 QIAquick PCR Purification 试剂盒(QIAGEN)纯化 PCR 产物, 用 NdeI 和 EcoRI 消化, 得到的 DNA 片段然后克隆到 pSCFVT7 载体, 该载体中已用 NdeI 和 EcoRI 消化去除了 pel B 信号序列。经 DNA 测序后, 将产生的包含带有目的 DNA 序列的 DNA 片段的质粒命名为“pscM2DEm02”(参见图 23)。质粒 pscM2DEm02 中包含的源于抗体 MABL-2 的单链 Fv, 其核苷酸序列和氨基酸序列如 SEQ ID No. 29 所示。

#### 5.11 在 *E. coli* 细胞中表达源于抗体 MABL-2 的单链 Fv

用 pscM2DEm02 载体转化 *E. coli* BL21(DE3)pLysS (STRATAGENE), 得到表达源于抗体 MABL-2 的单链 Fv 的 *E. coli* 菌株。用 SDS-PAGE 检查得到的克隆中目的蛋白质的表达, 选择表达水平高的克隆, 作为源于抗体 MABL-2 的单链 Fv 的生产菌株。

#### 5.12 纯化 *E. coli* 中产生的源于抗体 MABL-2 的单链 Fv

将转化获得的 *E. coli* 单克隆在 3ml LB 培养基中, 28 $^{\circ}$ C 培养 7 小时, 然后在 70ml LB 培养基中 28 $^{\circ}$ C 培养过夜。将预培养物转移到 7L LB 培养基中, 300 转/分搅拌, 用 Jar 发酵罐 28 $^{\circ}$ C 培养。培养基吸光度达到 O.D.=1.5 时, 用 1mM IPTG 诱导细菌, 然后培养 3 小时。

培养基离心(10000 $\times$ g, 10 分钟)回收细菌沉淀物。向细菌中加入含 5mM EDTA、0.1M NaCl 和 1% Triton x-100 的 50mM Tris-HCl 缓冲液(pH8.0), 超声波破碎细菌(输出量: 4, 工作循环: 70%, 1 分钟 $\times$ 10 次)。离心破碎细菌的悬浮液(12000g, 10 分钟), 以沉淀包涵体。将分离的包涵体与含 5 mM EDTA、0.1M NaCl 和 4%Triton x-100 的 50mM Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)混合, 再次超声处理(输出量: 4, 工作循环: 50%, 30 秒 $\times$ 2 次), 离心(12000g, 10 分钟)分离目的蛋白质沉淀, 去除上清中包含的蛋白质。

在含 6M 脲、5mM EDTA 和 0.1M NaCl 的 50mM Tris-HCl 缓冲液

(pH8.0) 中裂解含目的蛋白质的包涵体, 上样到 Sephacryl S-300 凝胶过滤柱(5 ×90cm, Amersham Pharmacia), 该柱用含 4M 脲、5mM EDTA、0.1M NaCl 和 10mM 巯基乙醇的 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0) 平衡, 流速为 5ml/分钟, 以去除相关的高分子量单链 Fv。经 SDS-PAGE 分析得到的组分, 用凝胶过滤所用缓冲液将高纯度的蛋白质组分稀释到  $0. D_{280}=0.25$ 。然后用含 5mM EDTA、0.1M NaCl、0.5M Arg、2mM 还原型各胱昔肽以及 0.2mM 氧化型谷胱昔肽的 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0), 透析该组分 3 次, 以使蛋白质重折叠。进一步用含 0.15M NaCl 的 20mM 乙酸盐缓冲液 (pH6.0) 透析该组分三次, 以更换缓冲液。

将透析产物上样到 Superdex 200pg 凝胶过滤柱 (2.6 ×60cm, Amersham Pharmacia), 该柱已用含 0.15M NaCl 的 20mM 乙酸盐缓冲液 (pH6.0) 平衡, 以去除少量通过分子间 S-S 键交联的高分子量蛋白质。如图 24 所示, 在宽峰(预期为高分子量聚集物)后洗脱出两个峰, 即主峰和副峰。SDS-PAGE 分析(参见图 21)以及凝胶过滤分析这两个峰的洗脱位置, 提示主峰是单链 Fv 单体, 副峰是非共价结合的单链 Fv 二聚体。非共价结合的二聚体占总单链 Fv 的 4%。

### 5.13 源于抗体 MABL-2 的单链 Fv 的体外凋亡诱导活性

利用引入人 IAP 基因的 L1210 细胞 (hIAP/L1210), 按照两种 Annexin-V 染色(Boehringer Mannheim)方法, 检测 CHO 细胞和 *E. coli* 产生的源于抗体 MABL-2 的单链 Fv (MABL2-scFv) 的凋亡诱导作用。

第一种方法中, 向  $5 \times 10^4$  个 hIAP/L1210 细胞中加入样品抗体, 终浓度为  $3\mu\text{g/ml}$ , 培养 24 小时。分析样品抗体, 即实施例 5.9 中获得的来自 CHO 细胞的 MABL-2 单链 Fv 的单体和二聚体, 实施例 5.12 中从 *E. coli* 获得的 MABL-2 单链 Fv 的单体和二聚体, 以及作对照的小鼠 IgG 抗体。培养后进行 Annexin-V 染色, 用 FACSscan 装置 (BECTON DICKINSON) 测量其荧光强度。

第二种方法中, 向  $5 \times 10^4$  个 hIAP/L1210 细胞中加入样本抗体, 终浓度为  $3\mu\text{g/ml}$ , 培养 2 小时, 并与抗 FLAG 抗体 (SIGMA) 混合, 终浓度为  $15\mu\text{g/ml}$ , 再培养 22 小时。分析样本抗体, 它们是从实施例 5.9

的 CHO 细胞获得的 MABL-2 单链 Fv 的单体, 以及作对照的小鼠 IgG 抗体。培养后进行 Annexin-V 染色, 使用 FACScan 装置测量其荧光强度。

Annexin-V 染色分析的结果如图 25-31 所示。结果表明, CHO 细胞和 *E. coli* 中产生的 MABL-2 单链 Fv 多肽的二聚体, 与对照相比(图 25), 可显著诱导细胞死亡(图 26, 27), 而针对 CHO 细胞和 *E. coli* 中产生的 MABL-2 单链 Fv 多肽的单体, 则没有观察到凋亡诱导作用(图 28, 29)。当一起使用抗 FLAG 抗体时, 与对照相比(图 30), CHO 细胞中产生的源于 MABL-2 抗体的单链 Fv 多肽的单体显著诱导细胞死亡(图 31)。

#### 5.14 scFv/CHO 多肽的单体和二聚体对人骨髓瘤模型小鼠的抗肿瘤效应

##### (1) 定量测量小鼠血清中的人 IgG

利用以下 ELISA 方法测量小鼠血清中含有的、由人骨髓瘤细胞产生的人 IgG (M 蛋白质)。用 0.1%碳酸氢盐缓冲液 (pH9.6) 将山羊抗人 IgG 抗体 (BIOSOURCE, Lot#7902) 稀释到 1 $\mu$ g/ml, 向 96 孔板 (Nunc) 中每孔加入 100 $\mu$ l, 4 $^{\circ}$ C 温育过夜, 使抗体固定化。封闭后, 向每孔加入 100 $\mu$ l 逐步稀释的小鼠血清或作为标准的人 IgG (CAPPEL, Lot#00915), 室温下温育 2 小时。洗涤后, 加入 100 $\mu$ l 5000 倍稀释的碱性磷酸酶标记抗人 IgG 抗体 (BIOSOURCE, Lot#6202), 室温下温育 1 小时。洗涤后加入底物液。温育后, 使用 MICROPLATE READER Model 3550 (BioRad) 测量 405nm 处的吸光度。基于由人 IgG 标准品的吸光值得到的校准曲线, 计算小鼠血清中人 IgG 的浓度。

##### (2) 制备给药用抗体

在给药当天, 用无菌过滤的 PBS (-) 将 scFv/CHO 多肽的单体和二聚体分别稀释到 0.4mg/ml 或 0.25mg/ml, 制备给药用样品。

##### (3) 制备人骨髓瘤的小鼠模型

如下制备人骨髓瘤的小鼠模型。将在 SCID 小鼠 (Japan Clare) 体内传代的 KPMM2 细胞 (JP-App1. 7-236475) 悬浮于含 10%胎牛血清 (GIBCO-BRL) 的 RPMI1640 培养基中 (GIBCO-BRL), 调整为  $3 \times 10^7$  细

胞/ml。通过尾静脉将 200 $\mu$ l KPMM2 细胞悬液 ( $6 \times 10^6$  细胞/小鼠) 移植给 SCID 小鼠 (雄性, 6 周龄), 该 SCID 小鼠已于移植前一天皮下注射脱唾液酸 GM1 抗体 (WAKO JUNYAKU, 1 瓶溶于 5ml)。

#### (4) 抗体给药

将 (2) 中制备的抗体样本, 单体 (250 $\mu$ l) 和二聚体 (400 $\mu$ l) 通过尾静脉给药于 (3) 中制备的人骨髓瘤细胞模型小鼠。移植 KPMM2 细胞 3 天后开始给药, 每天 2 次, 进行 3 天。作为对照, 同样通过尾静脉给药 200 $\mu$ l 无菌过滤的 PBS (-), 一天 2 次, 进行 3 天。每组包含 7 只小鼠。

#### (5) 用人骨髓瘤模型小鼠评价 scFv/CHO 多肽的单体和二聚体的抗肿瘤效应

根据小鼠血清中人 IgG (M 蛋白质) 浓度的变化以及小鼠的存活时间, 用人骨髓瘤模型小鼠评价 scFv/CHO 多肽单体和二聚体的抗肿瘤效应。移植 KPMM2 细胞后 24 小时收集小鼠血清, 利用上述 (1) 中的 ELISA 方法测定人 IgG 浓度的变化。PBS (-) 给药组 (对照) 血清中人 IgG (M 蛋白质) 含量提高到约 8500 $\mu$ g/ml, 而 scFv/CHO 二聚体给药组的人 IgG 含量明显较低, 等于或少于对照组的十分之一。所以, 此结果表明 scFv/CHO 二聚体强烈抑制 KPMM2 细胞生长 (参见图 32)。如图 33 所示, 与 PBS (-) 给药组相比, 在 scFv/CHO 二聚体给药组观察到的存活时间明显延长。

如上所述可以确认, scFv/CHO 二聚体对于人骨髓瘤模型小鼠具有抗肿瘤效应。可以认为 scFv/CHO 二聚体, 即本发明的重建多肽, 其抗肿瘤效应是由于该重建多肽具有凋亡诱导作用。

#### 5.15 血细胞凝集反应实验

根据 Tokyo Kagaku Dojin 出版, 日本生物化学会编辑的 Zoku-Seikagaku Jikken Koza “Immuno-Biochemical Investigation”, 进行血细胞凝集反应测试并确定血细胞凝集反应。

用经肝素处理的注射器取健康供者血液, 用 PBS (-) 洗涤三次, 然后用 PBS (-) 制备终浓度 2% 的红细胞悬液。测试样本包括, MABL-2

抗体, CHO 细胞产生的单链 Fv 多肽的单体和二聚体, *E. coli* 产生的单链 Fv 多肽的单体和二聚体, 以及小鼠 IgG 对照 (ZYMED)。利用购自 Falcon 的园底 96 孔板研究血细胞凝集效应。每孔中加入 50 $\mu$ l 上述抗体样本, 以及 50 $\mu$ l 2%红细胞悬液, 于孔中混合。37 $^{\circ}$ C 温育 2 小时后, 将反应混合物 4 $^{\circ}$ C 保存过夜, 测定其血细胞凝集反应。对照为每孔 50 $\mu$ l PBS (-), 按同样方法进行血细胞凝集反应测试。使用的小鼠 IgG 和抗体 MABL-2 的抗体终浓度为 0.01、0.1、1.0、10.0 或 100.0 $\mu$ g/ml。使用的单链 Fv 终浓度为 0.004、0.04、0.4、4.0、40.0 或 80.0 $\mu$ g/ml, 只在 *E. coli* 产生的多肽二聚体情况下, 另外使用 160.0 $\mu$ g/ml。结果如表 2 所示。对于抗体 MABL-2 而言, 在大于 0.1 $\mu$ g/ml 浓度下观察到血细胞凝集反应, 而对单链 Fv 的单体和二聚体都没有观察到血细胞凝集反应。

表 2 血细胞凝集反应测试

|        | 对照 | 0.01 | 0.1 | 1   | 10  | 100 | $\mu$ g/mL |  |
|--------|----|------|-----|-----|-----|-----|------------|--|
| mIgG   | 1  | -    | -   | -   | -   | -   |            |  |
| MABL-2 | -  | -    | -   | -   | -   | -   |            |  |
| (完整)   | -  | -    | +   | +++ | +++ | ++  |            |  |

|          | 对照 | 0.004 | 0.04 | 0.4 | 4 | 40 | 80 | $\mu$ g/mL |  |
|----------|----|-------|------|-----|---|----|----|------------|--|
| scFv/CHO | 1  | -     | -    | -   | - | -  | -  |            |  |
| 单体       | -  | -     | -    | -   | - | -  | -  |            |  |
| scFv/CHO | -  | -     | -    | -   | - | -  | -  |            |  |
| 二聚体      | -  | -     | -    | -   | - | -  | -  |            |  |

|                      | 对照 | 0.004 | 0.04 | 0.4 | 4 | 40 | 80 | 160 | $\mu$ g/mL |  |
|----------------------|----|-------|------|-----|---|----|----|-----|------------|--|
| scFv/ <i>E. coli</i> | 1  | -     | -    | -   | - | -  | -  | -   |            |  |
| 单体                   | -  | -     | -    | -   | - | -  | -  | -   |            |  |
| scFv/ <i>E. coli</i> | -  | -     | -    | -   | - | -  | -  | -   |            |  |
| 二聚体                  | -  | -     | -    | -   | - | -  | -  | -   |            |  |

实施例 6 包含 2 个 H 链 V 区和 2 个 L 链 V 区的重建多肽 sc(Fv)<sub>2</sub>, 以及具有不同长度接头的抗体 MABL-2 scFv。

### 6.1 构建抗体 MABL-2 sc(Fv)<sub>2</sub> 表达质粒

利用下述 PCR 方法改造上述 pCHOM2, 其中包含源于上述 MABL-2 的

scFv 的编码 DNA，将产生的 DNA 片段插入 pCHOM2，以制备重建多肽 [sc(Fv)<sub>2</sub>]（其中包含源于抗体 MABL-2 的二个 H 链 V 区和二个 L 链 V 区）的表达质粒。

PCR 所用引物包括，EF1 引物（SEQ 2D No: 30）为正向引物，设计为可与 EF1 $\alpha$ 编码 DNA 杂交，和反向引物（SEQ ID No: 19），设计为可与 L 链 V 区 C 端编码 DNA 杂交，并包含接头区的编码 DNA 序列，以及包含 SalI 限制性酶识别位点的 VLLAS 引物（SEQ ID No: 31）。

100 $\mu$ l PCR 溶液包含 10 $\mu$ l 10x PCR 缓冲液#1、1mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM dNTPs（dATP, dGIP, dCTP 和 dTTP）、5 单位 KOD DNA 聚合酶（Toyobo, Inc.）、1 $\mu$ M 每种引物以及 100ng 模板 DNA（pCHOM2）。将该 PCR 溶液依次 94℃ 加热 30 秒、50℃ 30 秒以及 74℃ 1 分钟。重复此温度循环 30 次。

利用 QIAquick PCR Purification 试剂盒（QIAGEN）纯化 PCR 产物，并用 SalI 消化。将产生的 DNA 片段克隆到 pBluescript KS<sup>+</sup>载体（Toyobo, Inc.）。DNA 测序后，用 SalI 消化包含目的 DNA 序列的质粒，得到的 DNA 片段用快速 DNA Ligation 试剂盒（BOEHRINGER MANNHEIM）与经 SalI 消化的 pCHOM2 连接。DNA 测序后，将包含目的 DNA 序列的质粒命名为“pCHOM2(Fv)<sub>2</sub>”（参见图 34）。质粒 pCHOM2(Fv)<sub>2</sub> 中包含的抗体 MABL-2 sc(Fv)<sub>2</sub> 区，其核苷酸序列和氨基酸序列如 SEQ ID No. 32 所示。

## 6.2 制备具有不同长度接头的抗体 MABL-2 scFv 的表达质粒。

利用源于 MABL-2 的 H 链和 L 链编码 cDNA 作模板，如下所述制备 scFv，其中包含不同长度接头以及按[H 链] - [L 链]（下文称“HL”）或[L 链] - [H 链]（下文称“LH”）顺序设计的 V 区。

利用 pCHOM2(Fv)<sub>2</sub> 作模板，PCR 方法构建 HL 型 scFv。PCR 步骤中，使用引物对 CFHL-F1（SEQ ID No: 33）和 CFHL-R2（SEQ ID No: 34），或引物对 CFHL-F2（SEQ ID No: 35）和 CFHL-R1（SEQ ID No: 36），和 KOD 聚合酶。进行 PCR 程序，温度循环为 94℃ 30 秒、60℃ 30 秒和 72℃ 1 分钟，重复 30 次，以产生 5'端含有前导序列的 H 链 cDNA，

或其 3'端含有 FLAG 序列的 L 链 cDNA。混合所产生的 H 链和 L 链 cDNA，进行 PCR，温度循环为依次 94℃ 30 秒、60℃ 30 秒和 72℃ 1 分钟，重复 5 次，使用混合物为模板以及 KOD 聚合酶。向反应混合物中加入 CFHL-F1 和 CFHL-R1 引物，然后重复上述温度循环 30 次，进行 PCR 反应，以产生无接头的 HL-0 型 cDNA。

为构建 LH 型 scFv，利用 pGEM-M2L 和 pGEM-M2H 为模板，其中分别包含抗体 MABL-2 的 L 链 V 区和 H 链 V 区的编码 cDNA，进行 PCR 反应（参见 JP-App1. 11-63557）。使用引物对 T<sub>7</sub>（SEQ ID No: 37）和 CFLH-R2（SEQ ID No: 38），或引物对 CFLH-F2（SEQ ID No: 39）和 CFLH-R1（SEQ ID No: 40），以及 KOD 聚合酶（Toyobo Inc.）。温度循环为顺次 94℃ 30 秒、60℃ 30 秒和 72℃ 1 分钟，重复 30 次，进行 PCR 反应，以产生 5'端包含前导序列的 L 链 cDNA，或其 3'端包含 FLAG 序列的 H 链 cDNA。混合所产生的 L 链和 H 链 cDNA，以该混合物为模板，使用 KOD 聚合酶，温度循环包含依次 94℃ 30 秒、60℃ 30 秒和 72℃ 1 分钟，重复 5 次，进行 PCR。反应混合物中加入 T<sub>7</sub>和 CFLH-R1 引物，上述温度循环重复 30 次进行反应。以反应产物为模板，利用引物对 CFLH-F4（SEQ ID No: 41）和 CFLH-R1，温度循环包含依次 94℃ 30 秒、60℃ 30 秒和 72℃ 1 分钟，重复 30 次，进行 PCR，以产生无接头的 LH-0 型 cDNA。

产生的 LH-0 和 HL-0 型 cDNA 用 EcoRI 和 BamHI 限制性酶（Takara Shuzo）消化，将消化的 cDNA 用 Ligation High（Toyobo Inc.）分别引入哺乳动物表达质粒 INPEP4 中。用每个质粒转化感受态 *E. coli* JM109（Nippon Gene），利用 QIAGEN Plasmid Maxi 试剂盒（QIAGEN）从转化的 *E. coli* 中分离目的质粒。从而制备质粒 pCF2LH-0 和 pCF2HL-0。

为构建包含不同大小接头的 HL 型表达质粒，以 pCF2HL-0 为模板，使用的正义引物为 CFHL-X3（SEQ ID No: 42）、CFHL-X4（SEQ ID No: 43）、CFHL-X5（SEQ ID No: 44）、CFHL-X6（SEQ ID No: 45）或 CFHL-X7（SEQ ID No: 46），反义引物为与载体序列互补的 BGH-1（SEQ ID No: 47）。使

用 KOD 聚合酶进行 PCR 反应，温度循环包括依次 94℃ 30 秒、60℃ 30 秒以及 72℃ 1 分钟，重复 30 次，用限制性酶 XhoI 和 BamHI (Takara Shuzo) 消化反应产物。消化的片段分别用 Ligation High (Toyobo Inc.) 引入 pCF2HL-0 的 XhoI 和 BamHI 位点之间。用每个质粒转化 *E. coli* JM109 感受态，利用 Qiagen Plasmid Maxi 试剂盒从转化的 *E. coli* 中分离目的质粒。从而制备表达质粒 pCF2HL-3、pCF2HL-4、pCF2HL-5、pCF2HL-6 和 pCF2HL-7。

为构建在 COS7 细胞中瞬时表达的表达质粒，用限制性酶 EcoRI 和 BamHI (Takara Shuzo) 消化质粒 pCF2HL-0、pCF2HL-3、pCF2HL-4、pCF2HL-5、pCF2HL-6 和 pCF2HL-7，用琼脂糖凝胶电泳纯化产生的约 800bp 片段。利用 Ligation High (Toyobo Inc.) 分别将获得的片段引入表达质粒 pCOS1 的 EcoRI 和 BamHI 位点之间，用于在哺乳动物细胞中表达。用每个质粒转化 *E. coli* DH5α 感受态 (Toyobo Inc.)，使用 Qiagen Plasmid Maxi 试剂盒从转化的 *E. coli* 中分离目的质粒。从而制备表达质粒 CF2HL-0/pCOS1、CF2HL-3/pCOS1、CF2HL-4/pCOS1、CF2HL-5/pCOS1、CF2HL-6/pCOS1 和 CF2HL-7/pCOS1。

作为这些质粒的典型实例，质粒 CF2HL-0/pCOS1 的构建如图 35 所示，该质粒中包含的 MABL2-scFv <HL-0> 的核苷酸序列和氨基酸序列如 SEQ ID No. 48 所示。这些质粒中接头区的核苷酸序列和氨基酸序列也如图 36 所示。

为构建包含不同大小接头的 LH 型表达质粒，使用 pCF2LH-0 为模板，CFLH-X3 (SEQ ID No: 49)、CFLH-X4 (SEQ ID No: 50)、CFLH-X5 (SEQ ID No: 51)、CFLH-X6 (SEQ ID No: 52) 或 CFLH-X7 (SEQ ID No: 53) 为正义引物，与载体序列互补的 BGH-1 为反义引物。利用 KOD 聚合酶，温度循环包含依次 94℃ 30 秒、60℃ 30 秒和 72℃ 1 分钟，重复 30 次，进行 PCR 反应，反应产物用限制性酶 xhoI 和 BamHI 消化。利用 Ligation High 分别将消化的片段引入 pCF2LH-0 的 XhoI 和 BamHI 位点之间。每个质粒转化 *E. coli* DH5α 感受态 (Toyobo Inc.)，使用 Qiagen Plasmid Maxi 试剂盒从转化的 *E. coli* 中分离目的质粒。从而

制备表达质粒 pCF2LH-3、pCF2LH-4、pCF2LH-5、pCF2LH-6 和 pCF2LH-7。

为构建 COS7 细胞瞬时表达质粒，质粒 pCF2LH-0、pCF2LH-3、pCF2LH-4、pCF2LH-5、pCF2LH-6 和 pCF2LH-7 用限制性酶 EcoRI 和 BamHI (Takara Shuzo) 消化，用琼脂糖凝胶电泳纯化产生的约 800bp 片段。利用 Ligation High 分别将获得的片段引入哺乳动物细胞表达质粒 pCOS1 的 XhoI 和 BamHI 位点之间。用每个质粒转化 *E. coli* DH-5 $\alpha$  感受态 (Toyobo Inc.)，利用 Qiagen Plasmid Maxi 试剂盒从转化的 *E. coli* 中分离目的质粒。随后制备表达质粒 CF2LH-0/pCOS1、CF2LH-3/pCOS1、CF2LH-4/pCOS1、CF2LH-5/pCOS1、CF2LH-6/pCOS1 和 CF2LH-7/pCOS1。

作为这些质粒的典型实例，如图 37 所示构建质粒 CF2LH-0/pCOS1，该质粒中包含的 MABL2-scFv <LH-0> 的核苷酸序列和氨基酸序列如 SEQ ID No. 54 所示。这些质粒中接头区的核苷酸序列和氨基酸序列也如图 38 所示。

### 6.3 在 COS7 细胞中表达 scFv 和 sc(Fv)<sub>2</sub>

#### (1) 用含血清培养基制备培养上清

在 COS7 细胞中 (JCRB9127, Japan Health Sciences Foundation) 瞬时表达 HL 型和 LH 型的 scFv 和 sc(Fv)<sub>2</sub>。在 CO<sub>2</sub> 气体培养箱中，用含 10% 胎牛血清 (HyClone) 的 DMEM 培养基 (GIBCO BRL)，37℃ 传代培养 COS7 细胞。使用 Gene Pulser 装置 (BioRad)，通过电穿孔将实施例 6.2 制备的 CF2HL-0、3~7/pCOS1 或 CF2LH-0、3~7/pCOS1，或 pCHOM2 (Fv)<sub>2</sub> 转染 COS7 细胞。小杯中加入 DNA (10 $\mu$ g) 以及 0.25ml 含 2 $\times$ 10<sup>7</sup> 细胞/ml、10% FBS 和 5mM BES (SIGMA) 的 DMEM 培养基。维持 10 分钟后，用 0.17kv、950 $\mu$ F 电容脉冲处理混合物。室温恢复 10 分钟后，将电穿孔细胞转到 75cm<sup>3</sup> 培养瓶的 DMEM 培养基 (10% FBS) 中。培养 72 小时后，收集培养上清，离心去除细胞碎片。培养上清用 0.22 $\mu$ m 过滤器 (FALCON) 过滤，以获得培养上清 (下文称“CM”)。

#### (2) 用无血清培养基制备培养上清

将按与 (1) 相同方法转染的细胞转到 75cm<sup>3</sup> 培养瓶的 DMEM 培养

基(10%FBS)中培养过夜。培养后,弃去上清,用 PBS 洗涤细胞,然后加入 CHO-S-SFM II 培养基(GIBCO BRL)。培养 72 小时后,收集培养上清,离心去除细胞碎片,用 0.22 $\mu$ m 过滤器(FALCON)过滤以获得 CM。

#### 6.4 检测 COS7 CM 中的 scFv 和 sc(Fv)<sub>2</sub>

用 Western 印迹方法检测上述实施例 6.3 (2) 中制备的 COS7 CM 中的各种 MABL2-scFv 和 sc(Fv)<sub>2</sub>。

SDS-PAGE 电泳分析每个 COS7 的 CM,转到 REINFORCED NC 膜(Schleicher & Schuell)上。用 5%脱脂牛奶(Morinaga Nyu-gyo)封闭膜,TBS 洗涤。然后向其中加入抗 FLAG 抗体。膜在室温下温育并洗涤。加入过氧化物酶标记的小鼠 IgG 抗体(Jackson Immuno Research)。室温下温育并洗涤后,加入底物液(KirKegaard Perry Laboratories)显色(图 39)。

#### 6.5 流式细胞术

使用实施例 6.3 (1) 制备的 COS7 细胞培养上清,进行流式细胞术分析,将测定 MABL2-scFv 和 sc(Fv)<sub>2</sub>与人整合素相关蛋白质(IAP)抗原的结合。将待测培养上清或作对照的 COS7 细胞培养上清,加入  $2 \times 10^5$  个表达人 IAP 的小鼠白血病细胞 L1210。冰浴并洗涤后,加入 10 $\mu$ g/ml 小鼠抗 FLAG 抗体(SIGMA),然后温育并洗涤细胞。然后加入 FITC 标记的抗小鼠 IgG 抗体(BECTON DICKINSON),再次温育并洗涤细胞。利用 FACScan 装置(BECTON DICKINSON)测定荧光强度。流式细胞术结果显示,在细胞培养上清中,具有不同长度接头的 MABL2-scFv 和 sc(Fv)<sub>2</sub> 与人 IAP 的亲合力高(参见图 40a 和 40b)。

#### 6.6 体外凋亡诱导效应

通过 Annexin-V 染色(Boehringer Mannheim),利用转染人 IAP 基因的 L1210 细胞(hIAP/L1210),检测实施例 6.3 (1) 制备的 COS7 培养上清的凋亡诱导作用。

向  $5 \times 10^4$  个 hIAP/L1210 细胞中加入用每个载体转染的 COS7 细胞培养上清,或作对照的 COS7 细胞培养上清,终浓度为 10%,混合物培养 24 小时。然后进行 Annexin-V/PI 染色,利用 FACScan 装置(BEKTON

DICHINSON)测定荧光强度。结果表明, COS7 细胞 CM 中的 scFv <HL3、4、6、7, LH3、4、6、7> 以及 sc(Fv)<sub>2</sub>显著诱导了 hIAP/L1210 细胞的死亡。这些结果如图 41 所示。

#### 6.7 构建用于 CHO 细胞中表达 scFv 和 sc(Fv)<sub>2</sub> 的载体

为从培养上清中分离、纯化 MABL2-scFv 和 sc(Fv)<sub>2</sub>, 如下构建用于 CHO 细胞中表达的载体。

使用 Ligation High, 将实施例 6.2 制备的 pCF2HL-0、3~7 以及 pCF2LH-0、3~7 的 EcoRI-BamHI 片段, 引入 CHO 细胞表达载体 pCH01 的 EcoRI 和 BamHI 位点之间。用其转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态。使用 QIAGEN Plasmid Midi 试剂盒 (QIAGEN) 从转化的 *E. coli* 中分离质粒, 制备表达质粒 pCHOM2HL-0、3~7 以及 pCHOM2LH-0、3~7。

#### 6.8 制备表达 MABL2-scFv <HL-0、3~7>、MABL2-scFv <LH-0、3~7> 以及 sc(Fv)<sub>2</sub> 的 CHO 细胞, 并制备其培养上清

用实施例 6.7 构建的每个表达质粒 pCHOM2HL-0、3~7 和 pCHOM2LH-0、3~7, 以及 pCHOM2(Fv)<sub>2</sub> 载体, 转化 CHO 细胞, 以制备恒定表达每种重建多肽的 CHO 细胞。作为其典型实例, 恒定表达 MABL2-scFv <HL-5>或 sc(Fv)<sub>2</sub> 的 CHO 细胞, 如下所示制备。

通过限制性酶 PvuI 消化, 线性化表达质粒 pCHOM2HL-5 和 pCHOM2(Fv)<sub>2</sub>, 使用 Gene Pulser 装置 (BioRad) 通过电穿孔转染 CHO 细胞。向小杯中加入 DNA (10 $\mu$ g) 和 0.75ml 1 $\times$ 10<sup>7</sup> 细胞/ml 的 PBS, 用 1.5KV、25 $\mu$ F 电容脉冲处理。室温恢复 10 分钟后, 将电穿孔细胞转到含 10% 胎牛血清的包含核酸的  $\alpha$ -MEM 培养基中 (GIBCO BRL) 培养。培养过夜后, 弃去上清。用 PBS 洗涤细胞, 加入含 10% 胎牛血清的无核酸  $\alpha$ -MEM 培养基 (GIBCO BRL)。培养两周后, 将细胞在含 10nM (终浓度) 氨甲蝶呤 (SIGMA) 的培养基中培养, 然后是 50nM 和 100nM 的氨甲蝶呤。得到的细胞在 CHO-S-SFM II 无血清培养基 (GIBCO BRL) 中转瓶培养。收集培养上清, 离心去除细胞碎片, 用 0.22 $\mu$ m 孔径滤膜过滤, 分别获得 CM。

如上所述, 获得了恒定表达 MABL2-scFv <HL-0、-3、-4、-6、-7>

和<LH-0、-3、-4、-5、-6、-7>的 CHO 细胞及其 CM。

### 6.9 纯化 MABL2-scFv <HL-5>二聚体和 sc(Fv)<sub>2</sub>

利用下述两种纯化方法，从实施例 6.8 制备的 CM 中纯化 MABL2-scFv <HL-5>以及 sc(Fv)<sub>2</sub>。

#### <纯化方法 1>

利用位于多肽 C 端的 FLAG 序列，通过抗 FLAG 抗体亲和柱层析以及凝胶过滤纯化 HL-5 和 sc(Fv)<sub>2</sub>。用抗 FLAG M2 亲和凝胶 (SIGMA) 制备柱子 (7.9ml)，用含 150mM NaCl 的 50mM Tris-HCl 缓冲液 (TBS, pH7.5) 平衡，上样在 6.8 中得到的 1 升 CM。用 TBS 洗柱后，通过 0.1M 甘氨酸-HCl 缓冲液 (pH3.5) 洗脱 scFv。利用 SDS-PAGE 分析所得到的组分，确认洗脱了 scFv。将 scFv 组分与终浓度可高达 0.01% 的 Tween 20 混合，并用 Centricon-10 (MILIPORE) 浓缩。TSKgel G3000SWG 柱 (7.5×600mm) 用含 150mM NaCl 和 0.01% Tween 20 的 20mM 乙酸盐缓冲液 (pH6.0) 平衡后，将浓缩液上样。流速为 0.4ml/分，通过 280nm 的吸光度检测 scFv。在二聚体处洗脱的主要组分为 HL-5，单体处洗脱 sc(Fv)<sub>2</sub>。

#### <纯化方法 2>

使用离子交换层析、羟基磷灰石和凝胶过滤，三步纯化 HL-5 和 sc(Fv)<sub>2</sub>。在离子交换层析中，纯化 HL-5 使用 Q Sepharose Fast Flow 柱 (Pharmacia)，纯化 sc(Fv)<sub>2</sub> 使用 SP-sepharose Fast Flow 柱。在第二步之中及之后，用相同程序处理 HL-5 和 sc(Fv)<sub>2</sub>。

#### HL-5 的第一步

HL-5 的 CM 用含 0.02% Tween 20 的 20mM Tris-HCl 缓冲液 (pH9.0) 稀释 2 倍，然后用 1M Tris 调 pH 到 9.0。用含 0.02% Tween 20 的 20mM Tris-HCl 缓冲液 (pH8.5) 平衡 Q sepharose fast flow 柱后，将溶液上样。通过含 0.1 – 0.55M NaCl 线性梯度的相同缓冲液，洗脱柱上结合的多肽。经 SDS-PAGE 监测洗脱组分，收集含 HL-5 的洗脱组分，上样到第二步的羟基磷灰石上。

#### sc(Fv)<sub>2</sub> 的第一步

sc(Fv)<sub>2</sub>的CM用含0.02% Tween 20的20mM 乙酸盐缓冲液(pH5.5)稀释2倍,用1M 乙酸调pH到5.5。用含0.02% Tween 20的20mM 乙酸盐缓冲液(pH5.5)平衡SP-sepharose fast flow柱后,将溶液上样。通过含0~0.5M NaCl 线性梯度的缓冲液洗脱柱上结合的多肽。经SDS-PAGE 监测洗脱组分,收集包含sc(Fv)<sub>2</sub>的组分,上样到第二步的羟基磷灰石中。

### 第二步 HL-5 和 sc(Fv)<sub>2</sub>的羟基磷灰石层析

羟基磷灰石柱(I型, BIORAD)用含0.02% Tween 20的10mM 磷酸盐缓冲液(pH7.0)平衡后,分别上样第一步获得的HL-5和sc(Fv)<sub>2</sub>组分。用同一缓冲液洗柱后,利用直到0.5M 线性梯度的磷酸盐缓冲液,洗脱柱上结合的多肽。经SDS-PAGE 监测洗脱的组分,收集包含目的多肽的组分。

### 第三步 HL-5 和 sc(Fv)<sub>2</sub>的凝胶过滤

用CentriPrep-10(MILIPORE)分别浓缩第二步获得的每一组分,并上样到用含0.02% Tween 20和0.15M NaCl的20mM 乙酸盐缓冲液(pH6.0)平衡的Superdex 200柱(2.6×60cm, Pharmacia)。在二聚体处洗脱到HL-5, sc(Fv)HL-5和sc(Fv)<sub>2</sub>分别在单体处作为主要峰被洗脱。

两种纯化方法均难以检测HL-5单体,已证实当单链Fv的接头包含大约5个氨基酸时,形成的单链Fv二聚体产量高。此外,HL-5和sc(Fv)<sub>2</sub>的二聚体能够在纯化后4℃稳定保存一个月。

## 6.10 评价纯化的 scFv<HL-5>二聚体和 sc(Fv)<sub>2</sub>与抗原的结合活性

利用纯化的MABL2-scFv<HL-5>二聚体和纯化的sc(Fv)<sub>2</sub>进行流式细胞术分析,以评价其与人整合素相关蛋白质(IAP)抗原的结合。将10μg/ml 纯化的MABL2-scFv<HL-5>二聚体、纯化的sc(Fv)<sub>2</sub>、阳性对照抗体MABL-2或阴性对照小鼠IgG(Zymed),加入2×10<sup>5</sup>个表达人IAP的小鼠白血病L1210细胞(hIAP/L1210),或经pCOS1转化的L1210细胞(pCOS1/L1210)作对照。冰浴并洗涤后,加入10μg/ml 小鼠抗FLAG抗体(SIGMA),然后温育并洗涤细胞。向其中加入FITC标记的

抗小鼠 IgG 抗体 (BECTION DICKINSON), 再次温育并洗涤细胞。然后利用 FACSscan 装置 (BECTION DICKINSON) 测定荧光强度。

由于纯化的 MABL2-scFv<HL-5>二聚体和纯化的 sc(Fv)<sub>2</sub> 特异性结合 hIAP/L1210 细胞, 可以证实 scFv<HL-5>二聚体和 sc(Fv)<sub>2</sub> 对人 IAP 的亲和力高 (参见图 42)。

#### 6.11 纯化的 scFv<HL-5>二聚体和 sc(Fv)<sub>2</sub> 在体外的凋亡诱导效应

使用引入人 IAP 基因的 L1210 细胞 (hIAP/L1210) 以及人白血病细胞系 CCRF-CEM 细胞, 通过 Annexin-V 染色 (Boehringer Mannheim), 检测纯化的 MABL2-scFv<HL-5>二聚体和纯化的 sc(Fv)<sub>2</sub> 的凋亡诱导效应。

将不同浓度的纯化的 MABL2-scFv<HL-5>二聚体、纯化的 MABL2-sc(Fv)<sub>2</sub>、阳性对照抗体 MABL-2 或阴性对照小鼠 IgG, 加入  $5 \times 10^4$  个 hIAP/L1210 细胞或  $1 \times 10^5$  个 CCRF-CEM 细胞中。培养 24 小时后进行 Annexin-V 染色, 使用 FACSscan 装置 (BECTION DICKINSON) 测定其荧光强度。结果, MABL2-scFv<HL-5>二聚体和 MABL2-sc(Fv)<sub>2</sub> 以浓度依赖方式显著诱导 hIAP/L1210 和 CCRF-CEM 细胞死亡 (参见图 43)。

#### 6.12 纯化的 scFv<HL-5>二聚体和 sc(Fv)<sub>2</sub> 的血细胞凝集反应测试

按照实施例 5.15 方法, 使用不同浓度的纯化的 scFv<HL-5>二聚体和纯化的 sc(Fv)<sub>2</sub>, 进行血细胞凝集反应测试。

用抗体 MABL-2 作为阳性对照, 观察到血细胞凝集反应, 而对单链抗体 MABL2-sc(Fv)<sub>2</sub> 和 MABL2-scFv<HL-5>均未观察到血细胞凝集反应。此外, 抗体 MABL-2 使用两种缓冲液进行血细胞凝集反应, 没有实质差别。这些结果如表 3 所示。

表 3

血细胞凝集反应测试

| 稀释剂: PBS                            |      | (μg/mL) |       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|-------------------------------------|------|---------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 对照                                  | 28.9 | 14.45   | 7.225 | 3.6125 | 1.8063 | 0.9031 | 0.4516 | 0.2258 | 0.1129 | 0.0564 | 0.0282 | 0.0141 | 0.0071 | 0.0035 | 0.0018 |
| MABL2-sc(Fv) <sub>2</sub>           | -    | -       | -     | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      |
| 对照                                  | 28.0 | 14.0    | 7.0   | 3.5    | 1.75   | 0.875  | 0.4375 | 0.2188 | 0.1094 | 0.0547 | 0.0273 | 0.0137 | 0.0068 | 0.0034 | 0.0017 |
| MABL2-sc(Fv) <sub>&lt;HL5&gt;</sub> | -    | -       | -     | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      |
| 对照                                  | 80   | 40      | 20    | 10     | 5      | 2.5    | 1.25   | 0.625  | 0.3125 | 0.1563 | 0.0781 | 0.0391 | 0.0195 | 0.0098 | 0.0049 |
| MABL2(完整)                           | -    | +       | +     | +      | +      | +      | +      | +      | +      | ±      | -      | -      | -      | -      | -      |
| mIgG                                | -    | -       | -     | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      |
| 稀释剂: 乙酸盐                            |      |         |       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| 对照                                  | 80   | 40      | 20    | 10     | 5      | 2.5    | 1.25   | 0.625  | 0.3125 | 0.1563 | 0.0781 | 0.0391 | 0.0195 | 0.0098 | 0.0049 |
| MABL2(完整)                           | -    | +       | +     | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | +      | -      | -      | -      | -      |

### 6.13 纯化的 scFv<HL-5>二聚体和 sc(Fv)<sub>2</sub> 对人骨髓瘤模型小鼠的抗肿瘤效应

测试实施例 6.8 和 6.9 制备和纯化的 scFv<HL-5>二聚体和 sc(Fv)<sub>2</sub> 的抗肿瘤效应。利用实施例 5.1 产生的人骨髓瘤小鼠模型, ELISA 测定小鼠血清中人骨髓瘤细胞产生的 M 蛋白质的量, 并检测小鼠的存活时间, 进行测试。然后根据小鼠血清中 M 蛋白质的数量变化以及小鼠的存活时间, 评价 scFv<HL-5>二聚体和 sc(Fv)<sub>2</sub> 的抗肿瘤效应。

测试中使用 0.01、0.1 或 1mg/ml 的 HL-5 和 sc(Fv)<sub>2</sub>, 它们溶于包含 150mM NaCl、0.02% Tween 和 20mM 乙酸盐缓冲液 (pH6.0) 的载体中, 按 0.1、1 或 10mg/kg 剂量对小鼠给药。对照组小鼠只给予载体。分段移植人骨髓瘤细胞 26 天后, 收集小鼠血清, 按实施例 5.14 方法, ELISA 测定血清中 M 蛋白质的数量。结果, 给予 HL-5 二聚体和 sc(Fv)<sub>2</sub> 的两组小鼠的血清 M 蛋白质数量, 均以剂量依赖性方式下降 (参见图 44)。此外, 与给予载体的对照组相比, 观察到给予 HL-5 (图 45) 和 sc(Fv)<sub>2</sub> (图 46) 的两组, 其存活时间均显著延长。这些结果表明, 本发明的 HL-5 和 sc(Fv)<sub>2</sub> 具有极好的体内抗肿瘤效应。

#### 附图说明

图 1 表示流式细胞术结果, 表明人 IgG 抗体不结合表达人 IAP 的 L1210 细胞 (hIAP/L1210)。

图 2 表示流式细胞术结果, 表明嵌合 MABL-1 抗体特异性结合表达人 IAP 的 L1210 细胞 (hIAP/L1210)。

图 3 表示流式细胞术结果, 表明嵌合 MABL-2 抗体特异性结合表达人 IAP 的 L1210 细胞 (hIAP/L1210)。

图 4 图解根据本发明单链 Fv 的产生过程。

图 5 阐明表达质粒的结构, 该质粒可用于在 *E. coli* 中表达本发明单链 Fv 的编码 DNA。

图 6 阐明表达质粒的结构, 该质粒可用于在哺乳动物细胞中表达本发明单链 Fv 的编码 DNA。

图 7 显示实施例 5.4 中 Western 印迹的结果图。从左侧开始为, 分子量标志 (从上面显示 97.4、66、45、31、21.5 和 14.5kDa)、引入 pCHO1 的 COS7 细胞培养上清、以及引入 pCHOM2 的 COS7 细胞培养上清。表明在引入 pCHOM2 的 COS7 细胞培养上清中包含抗体 MABL-2 的重建单链 Fv (箭头)。

图 8 表示流式细胞术结果, 表明作对照的 pCHO1/COS7 细胞培养上清中的抗体, 不结合 pCOS1/L1210 对照细胞。

图 9 表示流式细胞术结果, 表明 MABL2-scFv/COS7 细胞培养上清中的抗体, 不结合 pCOS1/L1210 对照细胞。

图 10 表示流式细胞术结果, 表明作对照的 pCOS1/COS7 细胞培养上清中的抗体不结合 hIAP/L1210 细胞。

图 11 表示流式细胞术结果, 表明 MABL2-scFv/COS7 细胞培养上清中的抗体特异性结合 hIAP/L1210 细胞。

图 12 表示实施例 5.6 中竞争性 ELISA 结果, 其中以对小鼠单克隆抗体 MABL-2 结合抗原的抑制作用为指征, 与对照的 pCHO1/COS7 细胞培养上清比较, 阐明本发明单链 Fv (MABL2-scFv) 的抗原结合活性。

图 13 表示实施例 5.7 中凋亡诱导效应的结果, 表明作对照的 pCOS1/COS7 细胞培养上清中的抗体, 不能诱导 pCOS1/L1210 对照细胞凋亡。

图 14 表示实施例 5.7 中凋亡诱导效应的结果, 表明 MABL2-scFv/COS7 细胞培养上清中的抗体, 不能诱导 pCOS1/L1210 对照细胞凋亡。

图 15 表示实施例 5.7 中凋亡诱导效应的结果, 表明作对照的 pCHO1/COS7 细胞培养上清中的抗体, 不能诱导 hIAP/L1210 细胞凋亡。

图 16 表示实施例 5.7 中凋亡诱导效应的结果, 表明 MABL2-scFv/COS7 细胞培养上清中的抗体, 特异性诱导 hIAP/L1210 细胞凋亡。

图 17 表示实施例 5.7 中凋亡诱导效应的结果, 表明作对照的 pCHO1/COS7 细胞培养上清中的抗体, 不能诱导 CCRF-CEM 细胞凋亡 (终

浓度 50%)。

图 18 表示实施例 5.7 中凋亡诱导效应的结果，表明 MABL2-scFv/COS7 细胞培养上清中的抗体，特异性诱导 CCRF-CEM 细胞凋亡（终浓度 50%）。

图 19 表示实施例 5.9 纯化 CHO 细胞产生的源于抗体 MABL-2 的单链 Fv 所得到的层析结果，表明用羟基磷灰石柱纯化来自 Blue-sepharose 柱的组分时，获得的主要峰，组分 A 和组分 B。

图 20 表示实施例 5.9-(2) 获得的组分 A 和组分 B 的凝胶过滤纯化结果，表明组分 A 在表观分子量约 36kD 处、以及组分 B 在约 76kD 处洗脱的主要峰（分别为 AI 和 BI）。

图 21 为实施例 5.9 纯化 CHO 细胞产生的源于抗体 MABL-2 的单链 Fv 所获得组分的 SDS-PAGE 分析，表明两个组分中都观察到分子量约 35kD 的单一一条带。

图 22 表示凝胶过滤纯化 CHO 细胞产生的源于抗体 MABL-2 的单链 Fv 所获得组分 AI 和 BI 的分析结果，其中组分 AI 包含单体，组分 BI 包含二聚体。

图 23 阐明表达质粒的结构，其可用于在 *E. coli* 中表达本发明单链 Fv 的编码 DNA。

图 24 表示实施例 5.12 凝胶过滤柱纯化 *E. coli* 产生的源于抗体 MABL-2 的单链 Fv 多肽粗产物的结果，其中每个峰分别表示 *E. coli* 产生的单链 Fv 的单体或二聚体。

图 25 表示实施例 5.13 中凋亡诱导效应的结果，表明作对照的小鼠 IgG 抗体，不能诱导 hIAP/L1210 细胞凋亡（终浓度 3 $\mu$ g/ml）。

图 26 表示实施例 5.13 中凋亡诱导效应的结果，表明 CHO 细胞产生的 MABL2-scFv 二聚体，显著诱导 hIAP/L1210 细胞凋亡（终浓度 3 $\mu$ g/ml）。

图 27 表示实施例 5.13 中凋亡诱导效应的结果，表明 *E. coli* 产生的 MABL2-scFv 二聚体，显著诱导 hIAP/L1210 细胞凋亡（终浓度 3 $\mu$ g/ml）。

图 28 表示实施例 5.13 中凋亡诱导效应的结果, 表明 CHO 细胞产生的 MABL2-scFv 单体对 hIAP/L1210 细胞的凋亡诱导, 与对照处于相同水平 (终浓度 3 $\mu$ g/ml)。

图 29 表示实施例 5.13 中凋亡诱导效应的结果, 表明 *E. coli* 产生的 MABL2-scFv 单体对 hIAP/L1210 细胞的凋亡诱导, 与对照处于相同水平 (终浓度 3 $\mu$ g/ml)。

图 30 表示实施例 5.13 中凋亡诱导效应的结果, 表明作对照的小鼠 IgG 抗体, 即使加入抗 FLAG 抗体, 也不能诱导 hIAP/L1210 细胞凋亡 (终浓度 3 $\mu$ g/ml)。

图 31 表示实施例 5.13 中凋亡诱导效应的结果, 表明 CHO 细胞产生的 MABL2-scFv 单体, 当加入抗 FLAG 抗体时, 显著诱导 hIAP/L1210 细胞凋亡 (终浓度 3 $\mu$ g/ml)。

图 32 表示在人骨髓瘤细胞系 KPMM2 移植小鼠的血清中, 人 IgG 的定量测量结果, 显示小鼠中由人骨髓瘤细胞产生的人 IgG 数量。表明 scFv/CHO 二聚体显著抑制 KPMM2 细胞生长。

图 33 表示小鼠在移植肿瘤后的存活时间, 表明 scFv/CHO 二聚体给药组存活时间显著延长。

图 34 阐明表达质粒的结构, 其可表达包含源于抗体 MABL-2 的两个 H 链 V 区和两个 L 链 V 区的重建多肽[sc(Fv)<sub>2</sub>]。

图 35 阐明表达 scFv (HL 型) 质粒的结构, 其中 V 区通过没有肽接头的 [H 链]-[L 链] 方式连接。

图 36 阐明 HL 型多肽的结构以及肽接头的氨基酸序列。

图 37 阐明表达 scFv (LH 型) 质粒的结构, 其中 V 区通过没有肽接头的 [L 链]-[H 链] 方式连接。

图 38 阐明 LH 型多肽的结构以及肽接头的氨基酸序列。

图 39 表示实施例 6.4 Western 印迹的结果, 表明表达了包含两个 H 链 V 区和两个 L 链 V 区的重建多肽 sc(Fv)<sub>2</sub>、以及具有不同长度肽接头的 MABL2-scFv。

图 40a 和 40b 表示实施例 6.3(1) 制备的 COS7 细胞培养上清的流

式细胞术结果, 表明 MABL2-scFv 和具有不同长度肽接头的  $\text{sc}(\text{Fv})_2$  对人 IAP 的亲合力高。

图 41 表示实施例 6.6 凋亡诱导效应的结果, 表明  $\text{scFv}<\text{HL3、4、6、7、LH3、4、6 和 7}>$  以及  $\text{sc}(\text{Fv})_2$ , 显著诱导 hIAP/L1210 细胞死亡。

图 42 表示实施例 6.10 抗原结合能力的评价结果, 表明  $\text{scFv}<\text{HL5}>$  二聚体和  $\text{sc}(\text{Fv})_2$  对人 IAP 的亲合力高。

图 43 表示实施例 6.11 体外凋亡诱导效应的结果, 表明  $\text{scFv}<\text{HL5}>$  二聚体和  $\text{sc}(\text{Fv})_2$  以浓度依赖方式诱导 hIAP/L1210 细胞和 CCRF-CEM 细胞凋亡。

图 44 表示在移植人骨髓瘤细胞的小鼠血清中, 由人骨髓瘤细胞系 KPMM2 产生的 M 蛋白质的定量测量结果。表明  $\text{scFv}<\text{HL5}>$  二聚体和  $\text{sc}(\text{Fv})_2$  显著抑制 KPMM2 细胞生长。

图 45 表示肿瘤移植后小鼠的存活时间(天), 表明  $\text{scFv}<\text{HL5}>$  给药组的存活时间显著延长。

图 46 表示肿瘤移植后小鼠的存活时间(天), 表明  $\text{sc}(\text{Fv})_2$  给药组的存活时间显著延长。

## 工业应用

本发明重建多肽所具有的特性为, 可诱导具有整合素相关蛋白质(IAP)的有核血细胞凋亡, 而不引起血细胞凝集反应, 并可用作血液病的治疗剂, 例如白血病, 如急性髓细胞性白血病、慢性骨髓性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、成人 T 细胞白血病、多发性骨髓瘤、混合型白血病和毛细胞白血病、恶性淋巴瘤(何杰金氏病、非何杰金氏淋巴瘤)、再生障碍性贫血、骨髓发育不良综合症以及真性红细胞增多症。

## 序列表

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> 能够诱导细胞凋亡的多肽

<130> FOP-415

<141> 2001-3-12

<150> US 09/523,095

<151> 2000-3-10

<150> JP2000-115246

<151> 2000-04-17

<150> JP2000-321822

<151> 2000-10-20

<160> 54

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 1

ccatcctaatacgcactcactatagggc 27

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 2

ggatcccggg tggatggtgg gaagatg 27

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 3

ggatcccggg ccagtgata gacagatg 28

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 4

ggatcccggg agtggataga ccgatg 26

<210> 5

<211> 394

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(393)

<223> pGEM-M1L. 1 ~ 57; 信号肽, 58 ~ 394; 成熟肽

<400> 5

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct 45

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro

5 10 15

gcg tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg 90

Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu

20 25 30

cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt 135

Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser

35 40 45

cag agc ctt cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac 180

Gln Ser Leu Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr

50 55 60

cta cag aag cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt 225

Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val

65 70 75

tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 270

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly

80 85 90

tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag 315

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

95 100 105

gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 360

Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr

110 115 120

acg tcc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa c 394

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

125

130

<210> 6

<211> 409

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(408)

<223> pGEM-M1H. 1 ~ 57; 信号肽, 58 ~ 409; 成熟肽

<400> 6

atg gaa tgg agc tgg ata ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca 45

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala

5

10

15

ggt gtc cac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg 90

Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu

10

25

30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35

40

45

tac acc ttc gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag cag aag cca 180

Tyr Thr Phe Val Asn His Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro

50

55

60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

65

70

75

ggt act aag tac aat gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act 270

Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr

80 85 90

tca gag aaa tcc tcc agc gca gcc tac atg gag ctc agc agc ctg 315

Ser Glu Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu

95 100 105

gcc tct gag gac tct gcg gtc tac tac tgt gca aga ggg ggt tac 360

Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr

110 115 120

tat agt tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405

Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser

125 130 135

tca g 409

Ser

<210> 7

<211> 394

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(393)

<223> pGEM-M2L. 1~57;信号肽, 58~394;成熟肽

<400> 7

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct 45

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro

5 10 15

ggt tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg 90

Gly Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu  
 20 25 30  
 cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt 135  
 Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser  
 35 40 45  
 cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac 180  
 Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr  
 50 55 60  
 ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt 225  
 Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val  
 65 70 75  
 tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 270  
 Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
 80 85 90  
 tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag 315  
 Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu  
 95 100 105  
 gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 360  
 Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr  
 110 115 120  
 acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa c 394  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 125 130

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 409

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(408)

&lt;223&gt; pGEM-M2H. 1~57;信号肽, 58~409;成熟肽

&lt;400&gt; 8

atg gaa tgg agc tgg ata ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca 45

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala

5 10 15

ggt gtc cac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg 90

Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu

20 25 30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35 40 45

tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca 180

Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro

50 55 60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

65 70 75

ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act 270

Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr

80 85 90

tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg 315

Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu

95 100 105

gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac 360

Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr

|                                                             |     |     |     |  |
|-------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|--|
|                                                             | 110 | 115 | 120 |  |
| tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc | 405 |     |     |  |
| Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser |     |     |     |  |
|                                                             | 125 | 130 | 135 |  |
| tca g                                                       |     |     | 409 |  |
| Ser                                                         |     |     |     |  |

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR 引物

&lt;400&gt; 9

cccaagcttc caccatgaag ttgcctgtta gg 32

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR 引物

&lt;400&gt; 10

cccaagcttc caccatggaa tggagctgga ta 32

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 11

cgcggtacca ctcacgtttt atttccagct tggc 34

<210> 12

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 12

cgcggtacca ctcacctgag gagactgtga gagg 34

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 13

catgccatgg cgcaggtcca gctgcagcag 30

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 14

accaccacct gaggagactg tgagagt 27

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 15

gtctcctcag gtggtggtgg ttcgggt 27

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 16

cacaacatcc gatccgccac caccga 27

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 17

ggcggatcgg atgttgtgat gacccaa 27

<210> 18

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 18

ccggaattct cattatttat cgtcatcgtc tttagtagtct tttatttcca gcttggt 57

<210> 19

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头氨基酸序列和核苷酸序列

<400> 19

ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

5

10

15

<210> 20

<211> 828

<212> DNA

<213> Mus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;CDS

&lt;222&gt;(1)...(826)

&lt;223&gt; pscM1. MABL1-scFv

&lt;400&gt; 20

atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc 45

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu

5 10 15

gct gcc caa cca gcc atg gcg cag gtc cag ctg cag cag tct gga 90

Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly

20 25 30

cct gac ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag 135

Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys

35 40 45

gct tct gga tac acc ttc gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag 180

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Val Asn His Val Met His Trp Val Lys

50 55 60

cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct 225

Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro

65 70 75

tac aat gat ggt act aag tac aat gag aag ttc aag ggc aag gcc 270

Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala

80 85 90

aca ctg act tca gag aaa tcc tcc agc gca gcc tac atg gag ctc 315

Thr Leu Thr Ser Glu Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu

95 100 105

agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tac tac tgt gca aga 360

Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 110                                                             | 115 | 120 |
| ggg ggt tac tat agt tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc 405 |     |     |
| Gly Gly Tyr Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu     |     |     |
| 125                                                             | 130 | 135 |
| aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tgc ggt ggt ggt tgc ggt 450     |     |     |
| Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly     |     |     |
| 140                                                             | 145 | 150 |
| ggt ggc gga tgc gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg 495 |     |     |
| Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu     |     |     |
| 155                                                             | 160 | 165 |
| cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt 540 |     |     |
| Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser     |     |     |
| 170                                                             | 175 | 180 |
| cag agc ctt cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac 585 |     |     |
| Gln Ser Leu Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr     |     |     |
| 185                                                             | 190 | 195 |
| cta cag aag cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt 630 |     |     |
| Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val     |     |     |
| 200                                                             | 205 | 210 |
| tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 675 |     |     |
| Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly     |     |     |
| 215                                                             | 220 | 225 |
| tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag 720 |     |     |
| Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu     |     |     |
| 230                                                             | 235 | 240 |
| gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 765 |     |     |
| Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr     |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |

acg tcc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac 810

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp

260

265

270

gat gac gat aaa taa tga

828

Asp Asp Asp Lys

<210> 21

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 21

acgcgtcgac tcccaggtcc agctgcagca g 31

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 22

gaaggtgtat ccagaagc 18

<210> 23

<211> 819

<212> DNA

<213> Mus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt;(1)...(813)

&lt;223&gt; pCHOM1. MABL1-scFv

&lt;400&gt; 23

```

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 45
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
      5              10              15

ggt gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg 90
Gly Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu
      20              25              30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
      35              40              45

tac acc ttc gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag cag aag cca 180
Tyr Thr Phe Val Asn His Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro
      50              55              60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp
      65              70              75

ggt act aag tac aat gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act 270
Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
      80              85              90

tca gag aaa tcc tcc agc gca gcc tac atg gag ctc agc agc ctg 315
Ser Glu Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
      95              100             105

gcc tct gag gac tct gcg gtc tac tac tgt gca aga ggg ggt tac 360
Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr

```

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 110                                                             | 115 | 120 |
| tat agt tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405 |     |     |
| Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser     |     |     |
| 125                                                             | 130 | 135 |
| tca ggt ggt ggt ggt tgc ggt ggt ggt ggt tgc ggt ggt ggc gga 450 |     |     |
| Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly     |     |     |
| 140                                                             | 145 | 150 |
| tcg gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt 495 |     |     |
| Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser     |     |     |
| 155                                                             | 160 | 165 |
| ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt 540 |     |     |
| Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu     |     |     |
| 170                                                             | 175 | 180 |
| cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac cta cag aag 585 |     |     |
| Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys     |     |     |
| 185                                                             | 190 | 195 |
| cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga 630 |     |     |
| Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg     |     |     |
| 200                                                             | 205 | 210 |
| TTT TCT GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA 675 |     |     |
| Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr     |     |     |
| 215                                                             | 220 | 225 |
| gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga 720 |     |     |
| Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly     |     |     |
| 230                                                             | 235 | 240 |
| gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg tcc gga 765 |     |     |
| Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Ser Gly     |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |

ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat 810

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp

260

265

270

aaa taa tga 819

Lys

<210> 24

<211> 828

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(822)

<223> pscM2. MABL2-scFv

<400> 24

atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc 45

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu

5

10

15

gct gcc caa cca gcc atg gcg cag gtc cag ctg cag cag tct gga 90

Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly

20

25

30

cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag 135

Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys

35

40

45

gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag 180

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys

50

55

60

cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct 225

Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro  
 65 70 75  
 tac aat gat ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc 270  
 Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala  
 80 85 90  
 act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc 315  
 Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu  
 95 100 105  
 agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga 360  
 Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 110 115 120  
 ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc 405  
 Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu  
 125 130 135  
 aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt 450  
 Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 140 145 150  
 ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg 495  
 Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu  
 155 160 165  
 cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt 540  
 Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser  
 170 175 180  
 cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac 585  
 Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr  
 185 190 195  
 ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt 630  
 Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val

|                                                             |     |     |  |
|-------------------------------------------------------------|-----|-----|--|
| 200                                                         | 205 | 210 |  |
| tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga | 675 |     |  |
| Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly |     |     |  |
| 215                                                         | 220 | 225 |  |
| tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag | 720 |     |  |
| Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu |     |     |  |
| 230                                                         | 235 | 240 |  |
| gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac | 765 |     |  |
| Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr |     |     |  |
| 245                                                         | 250 | 255 |  |
| acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac | 810 |     |  |
| Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp |     |     |  |
| 260                                                         | 265 | 270 |  |
| gat gac gat aaa taa tga                                     | 828 |     |  |
| Asp Asp Asp Lys                                             |     |     |  |

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 819

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(813)

&lt;223&gt; pCHOM2. MABL2-scFv

&lt;400&gt; 25

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca | 45 |
| Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr |    |

5

10

15

ggt gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg 90

Gly Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu

20 25 30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35 40 45

tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca 180

Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro

50 55 60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

65 70 75

ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act 270

Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr

80 85 90

tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg 315

Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu

95 100 105

gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac 360

Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr

110 115 120

tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405

Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser

125 130 135

tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga 450

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

140 145 150

tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt 495

Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser  
 155 160 165  
 ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt 540  
 Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu  
 170 175 180  
 gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag 585  
 Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys  
 185 190 195  
 cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga 630  
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg  
 200 205 210  
 ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca 675  
 Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr  
 215 220 225  
 gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga 720  
 Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly  
 230 235 240  
 gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga 765  
 Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly  
 245 250 255  
 ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat 810  
 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp  
 260 265 270  
 aaa taa tga 819  
 Lys

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 456

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(450)

&lt;223&gt; pCHO-shIAP. 可溶的人 IAP

&lt;400&gt; 26

atg tgg ccc ctg gta gcg gcg ctg ttg ctg ggc tgc gcg tgc tgc 45

Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys

5

10

15

gga tca gct cag cta cta ttt aat aaa aca aaa tct gta gaa ttc 90

Gly Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe

20

25

30

acg ttt tgt aat gac act gtc gtc att cca tgc ttt gtt act aat 135

Thr Phe Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn

35

40

45

atg gag gca caa aac act act gaa gta tac gta aag tgg aaa ttt 180

Met Glu Ala Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe

50

55

60

aaa gga aga gat att tac acc ttt gat gga gct cta aac aag tcc 225

Lys Gly Arg Asp Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser

65

70

75

act gtc ccc act gac ttt agt agt gca aaa att gaa gtc tca caa 270

Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln

80

85

90

tta cta aaa gga gat gcc tct ttg aag atg gat aag agt gat gct 315

Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala

95

100

105

gtc tca cac aca gga aac tac act tgt gaa gta aca gaa tta acc 360

Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr

110

115

120

aga gaa ggt gaa acg atc atc gag cta aaa tat cgt gtt gtt tca 405

Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser

125

130

135

tgg ttt tct cca aat gaa aat gac tac aag gac gac gat gac aag 450

Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

140

145

150

tga tag 456

<210> 27

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 27

ggaattccat atgcaagtgc aacttcaaca gtctggacct gaactg 46

<210> 28

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 28

ggaattctca ttattttatt tccagcttgg t 31

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 741

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(735)

&lt;223&gt; pscM2DEm02. MABL2-scFv

&lt;400&gt; 29

atg caa gtg caa ctt caa cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct 45

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro

5 10 15

ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc 90

Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

20 25 30

gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc 135

Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly

35 40 45

ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act aag 180

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys

50 55 60

tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa 225

Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys

65 70 75

tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag 270

Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu

80 85 90

gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac 315  
 Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr  
 95 100 105  
 gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt 360  
 Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly  
 110 115 120  
 ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt 405  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val  
 125 130 135  
 gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat 450  
 Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp  
 140 145 150  
 caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt 495  
 Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 155 160 165  
 aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag 540  
 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln  
 170 175 180  
 tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg 585  
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly  
 185 190 195  
 gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca 630  
 Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr  
 200 205 210  
 ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc 675  
 Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe  
 215 220 225  
 tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc 720

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr

230

235

240

aag ctg gaa ata aaa taa tga 741

Lys Leu Glu Ile Lys

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 30

cagacagtgg ttcaaagt 18

<210> 31

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 31

cgcgtcgacc gatccgccac caccegaacc accaccaccc gaaccaccac caccttttat 60

ttccagcttg gt

72

<210> 32

<211> 1605

<212> DNA

<213> Mus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(1599)

&lt;223&gt; pCHOM2(Fv)2. MABL2-sc(Fv)2

&lt;400&gt; 32

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 45

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr

5 10 15

ggt gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg 90

Gly Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu

20 25 30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35 40 45

tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca 180

Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro

50 55 60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

65 70 75

ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act 270

Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr

80 85 90

tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg 315

Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu

95 100 105

gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac 360

Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr

|                                                             |     |     |  |
|-------------------------------------------------------------|-----|-----|--|
| 110                                                         | 115 | 120 |  |
| tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc | 405 |     |  |
| Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser |     |     |  |
| 125                                                         | 130 | 135 |  |
| tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga | 450 |     |  |
| Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly |     |     |  |
| 140                                                         | 145 | 150 |  |
| tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt | 495 |     |  |
| Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser |     |     |  |
| 155                                                         | 160 | 165 |  |
| ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt | 540 |     |  |
| Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu |     |     |  |
| 170                                                         | 175 | 180 |  |
| gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag | 585 |     |  |
| Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys |     |     |  |
| 185                                                         | 190 | 195 |  |
| cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga | 630 |     |  |
| Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg |     |     |  |
| 200                                                         | 205 | 210 |  |
| ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca | 675 |     |  |
| Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr |     |     |  |
| 215                                                         | 220 | 225 |  |
| gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga | 720 |     |  |
| Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly |     |     |  |
| 230                                                         | 235 | 240 |  |
| gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga | 765 |     |  |
| Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly |     |     |  |
| 245                                                         | 250 | 255 |  |

```

ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt 810
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
      260              265              270

ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gtc gac tcc cag gtc cag ctg 855
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Asp Ser Gln Val Gln Leu
      275              280              285

cag cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag 900
Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
      290              295              300

atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att 945
Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile
      305              310              315

cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga 990
His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
      320              325              330

tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat gag aag ttc 1035
Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
      335              340              345

aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc 1080
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala
      350              355              360

tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tat 1125
Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
      365              370              375

tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa 1170
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln
      380              385              390

ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt 1215

```

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 395 400 405  
 ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa agt 1260  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser  
 410 415 420  
 cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct 1305  
 Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser  
 425 430 435  
 tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat 1350  
 Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr  
 440 445 450  
 tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg 1395  
 Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu  
 455 460 465  
 atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc 1440  
 Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
 470 475 480  
 agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga 1485  
 Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 485 490 495  
 gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca 1530  
 Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr  
 500 505 510  
 cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 1575  
 His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 515 520 525  
 gac tac aaa gac gat gac gat aaa taa tga 1605  
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

530

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR 引物

&lt;400&gt; 33

tgaggaattc ccaccatggg atg 33

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR 引物

&lt;400&gt; 34

cacgacgtca ctcgagactg tgagagtggg gccttgccc 40

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR 引物

&lt;400&gt; 35

agtctcgagt gacgtcgtga tgacccaaag tccactctcc 40

<210> 36

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 36

gactggatcc tcattattta tcgtcatcgt c 31

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 37

cgcgtaatac gactcactat ag 22

<210> 38

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 38

gcaattggac ctgttttata tcgagcttgg tccccctcc gaacgt 46

<210> 39

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 39

gctcgagata aaacaggtcc aattgcagca gtctggacct gaact 45

<210> 40

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 40

gactggatcc tcattattta tcgtcatcgt cttttagtc tgaggagact gtgagagtgg 60

<210> 41

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 41

gactgaattc ccaccatgaa gttgcctgtt ag 32

<210> 42

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 42

cagtctcgag tggtaggtcc gacgtcgtga tgacccaaag 40

<210> 43

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 43

cagtctcgag tggtaggtgt tccgacgtcg tgatgaccca aag 43

<210> 44

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 44

cagtctcgag tggtaggtgt ggttccgacg tcgtgatgac ccaaag 46

<210> 45

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 45

cagtctcgag tggtaggtggt ggtggttccg acgtcgtgat gacccaaag 49

<210> 46

<211> 52

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 46

cagtctcgag tggtaggtggt ggtggtggtt ccgacgtcgt gatgacccaa ag 52

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 47

ggccgcatgt tgtcacgaat 20

<210> 48

<211> 780

<212> DNA

&lt;213&gt; Mus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(768)

&lt;223&gt; CF2HL-0/pCOS1. MABL2-scFv&lt;HL-0&gt;

&lt;400&gt; 48

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt gtc 51

MET Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val

5

10

15

gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg 102

Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly

20

25

30

gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc gct aac cat 153

Ala Ser Val Lys MET Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His

35

40

45

50

gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga 204

Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

55

60

65

tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac 255

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp

70

75

80

85

aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc 306

Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr MET Asp Leu

90

95

100

agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt 357

Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly

105

110

115

tac tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcg agt 408

Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 120 125 130 135  
 gac gtc gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat 459  
 Asp Val Val MET Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp  
 140 145 150  
 caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga 510  
 Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly  
 155 160 165 170  
 aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc 561  
 Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu  
 175 180 185  
 ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt 612  
 Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 190 195 200  
 ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct 663  
 Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu MET Ile Ser Arg Val Glu Ala  
 205 210 215 220  
 gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg 714  
 Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr  
 225 230 235  
 ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat 765  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp  
 240 245 250 255  
 aaa taa tga gga tcc 780  
 Lys

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 49

caagctcgag ataaaatccg gaggccaggt ccaattgcag cagtc 45

<210> 50

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 50

caagctcgag ataaaatccg gaggtggcca ggtccaattg cagcagtc 48

<210> 51

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 51

caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg ccaggtccaa ttgcagcagt c 51

<210> 52

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 52

caagctcgag ataaaatccg gagtggtgg tggccaggtc caattgcagc agtc 54

<210> 53

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 53

caagctcgag ataaaatccg gagtggtgg tggcggccag gtccaattgc agcagtc 57

<210> 54

<211> 780

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(768)

<223> CF2LH-0/pCOS1. MABL2-scFv<LH-0>

<400> 54

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct ggt tcc 51

MET Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu MET Phe Trp Ile Pro Gly Ser

5

10

15

agc agt gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt 102

Ser Ser Asp Val Val MET Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu  
 20 25 30  
 gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt 153  
 Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 35 40 45 50  
 aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca 204  
 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
 55 60 65  
 aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg 255  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg  
 70 75 80 85  
 ttc agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg 306  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu MET Ile Ser Arg Val  
 90 95 100  
 gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg 357  
 Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro  
 105 110 115  
 tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctc gag ata aaa cag gtc caa ttg cag 408  
 Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Val Gln Leu Gln  
 120 125 130 135  
 cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc 459  
 Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys MET Ser Cys  
 140 145 150  
 aag gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag 510  
 Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln  
 155 160 165 170  
 aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 561  
 Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

---

|                                                                         |     |     |     |
|-------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 175                                                                     | 180 | 185 |     |
| ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac 612 |     |     |     |
| Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp     |     |     |     |
| 190                                                                     | 195 | 200 |     |
| aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac 663 |     |     |     |
| Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr MET Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp     |     |     |     |
| 205                                                                     | 210 | 215 | 220 |
| tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg 714 |     |     |     |
| Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp     |     |     |     |
| 225                                                                     | 230 | 235 |     |
| ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca gac tac aaa gac gat gac gat 765 |     |     |     |
| Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp     |     |     |     |
| 240                                                                     | 245 | 250 | 255 |
| aaa taa tga gga tcc 780                                                 |     |     |     |
| Lys                                                                     |     |     |     |

图 1

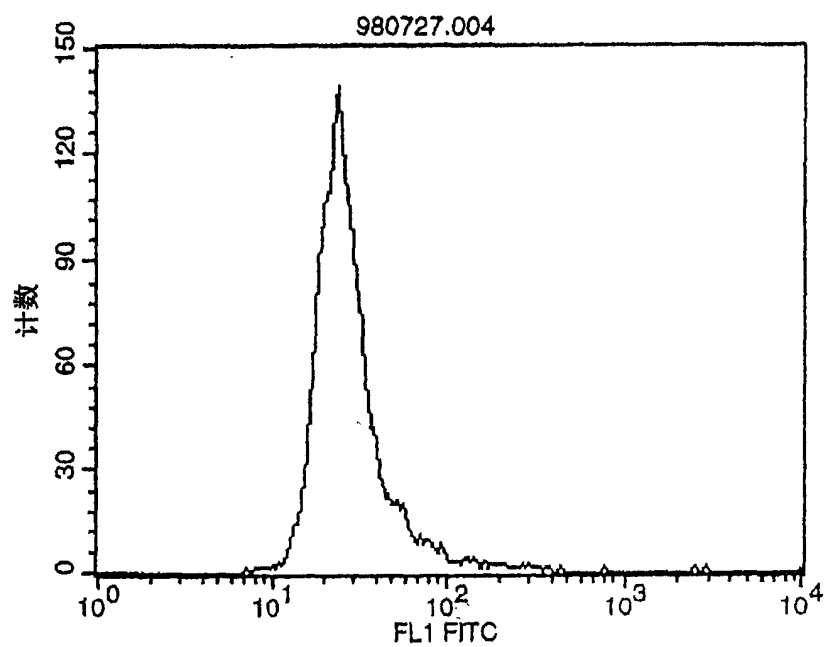


图 2

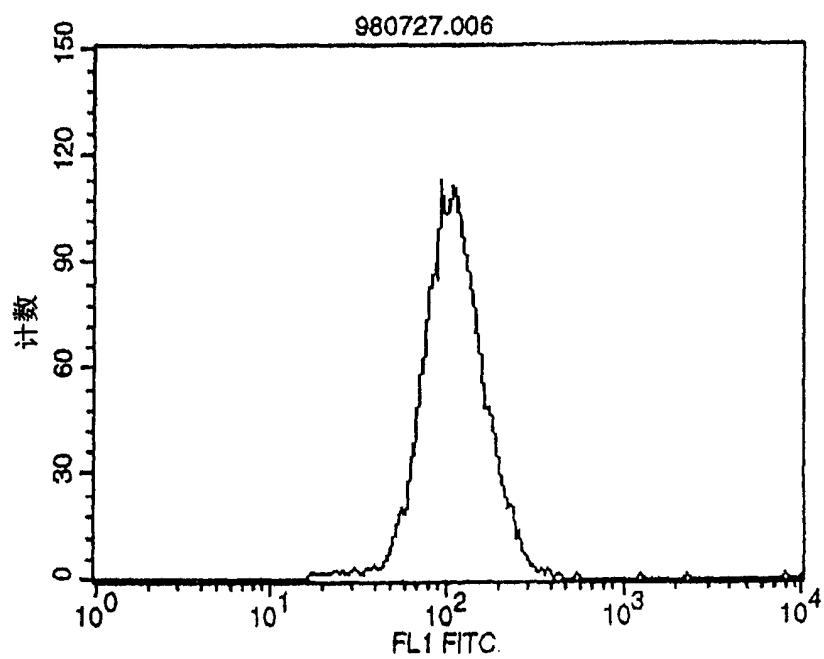


图 3

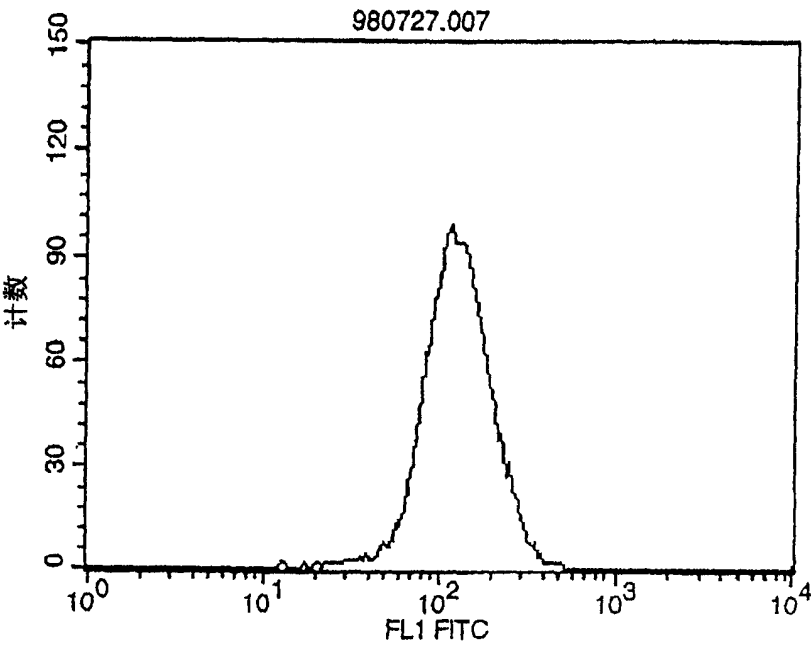


图 5

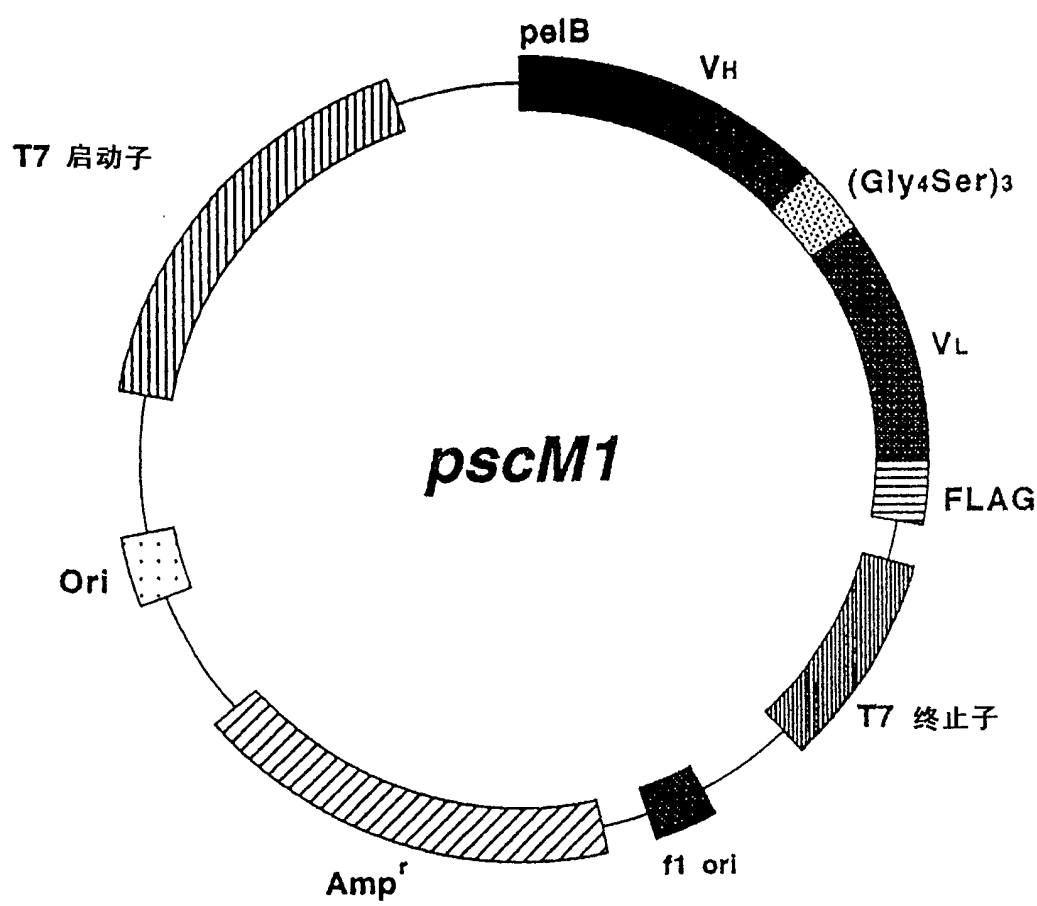


图 4

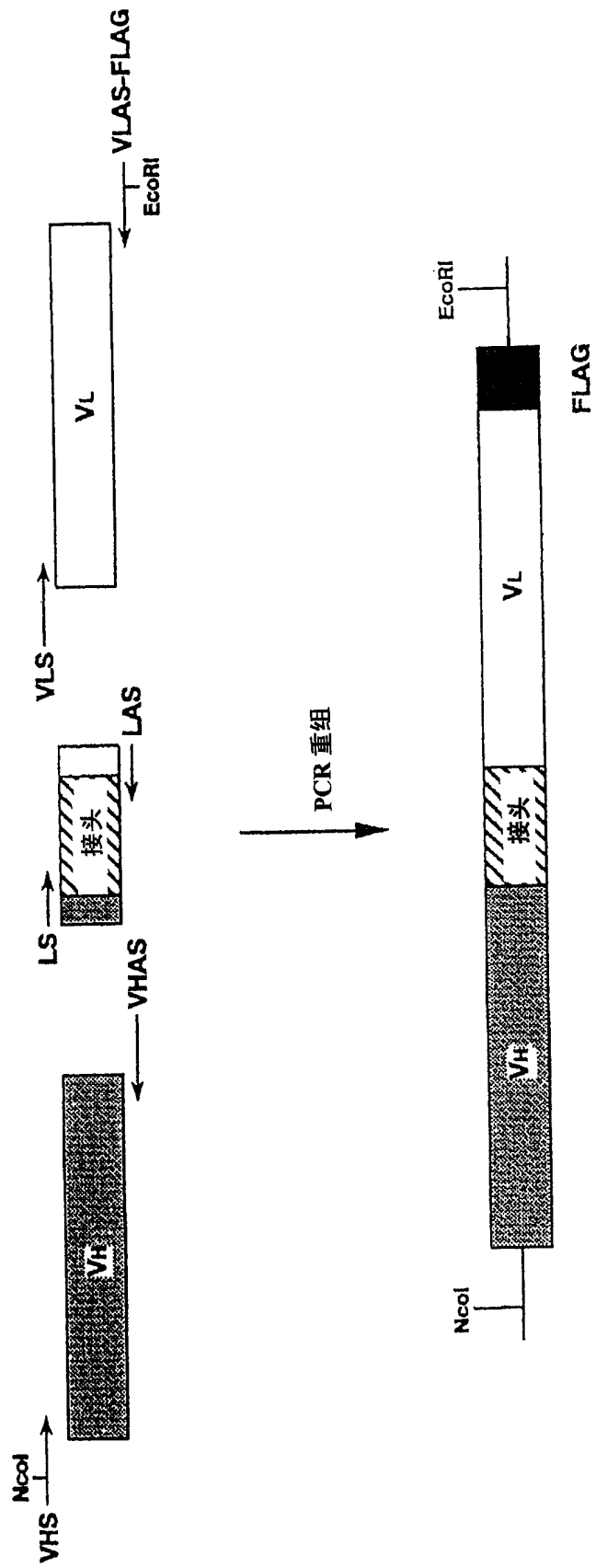


图 6

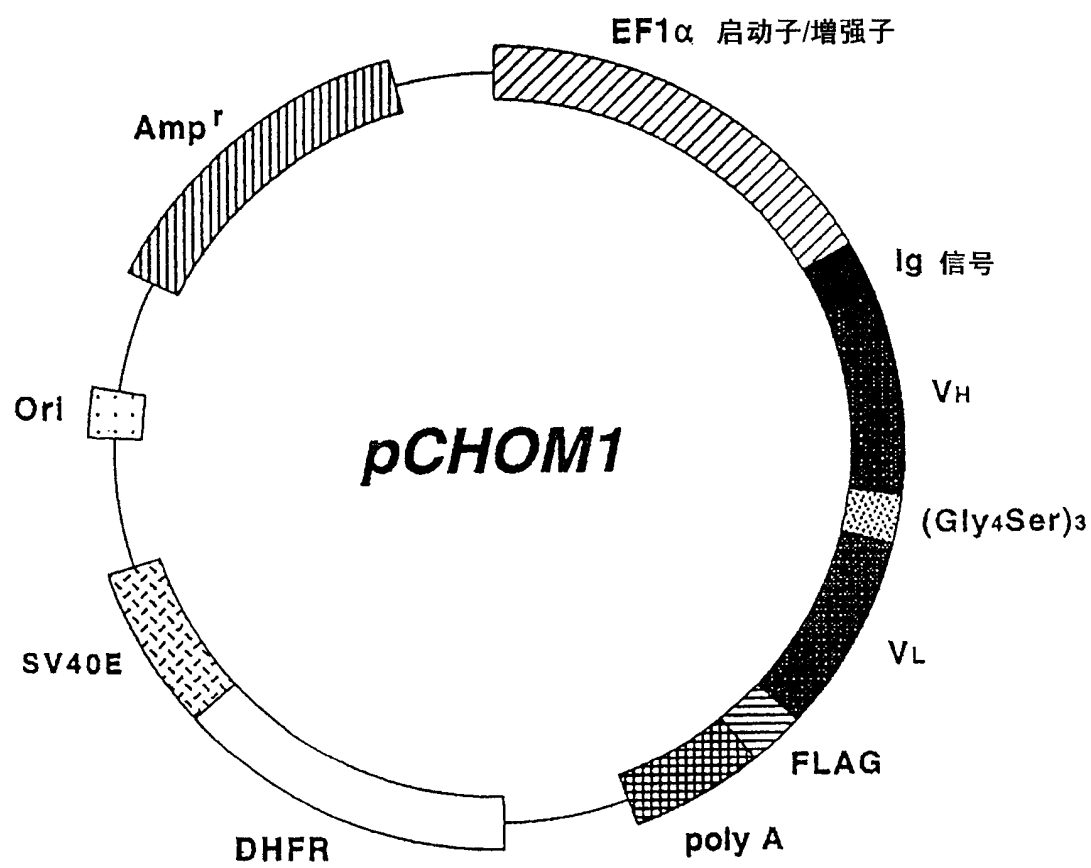


图 7

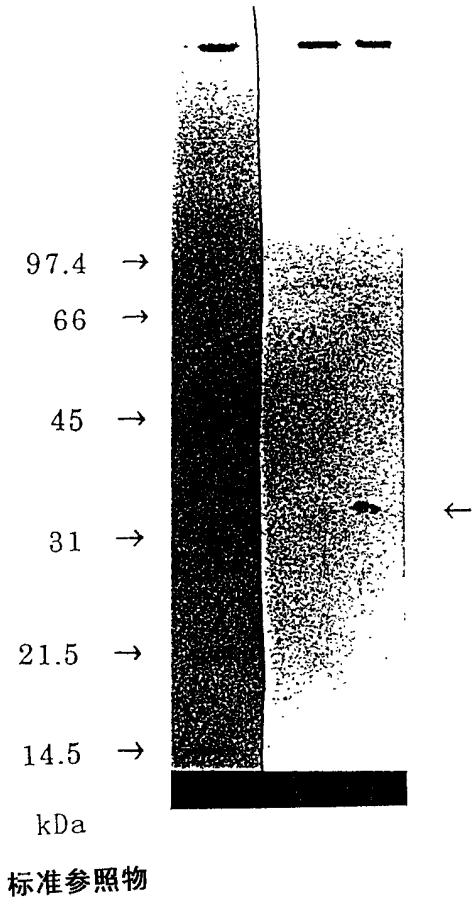


图 8

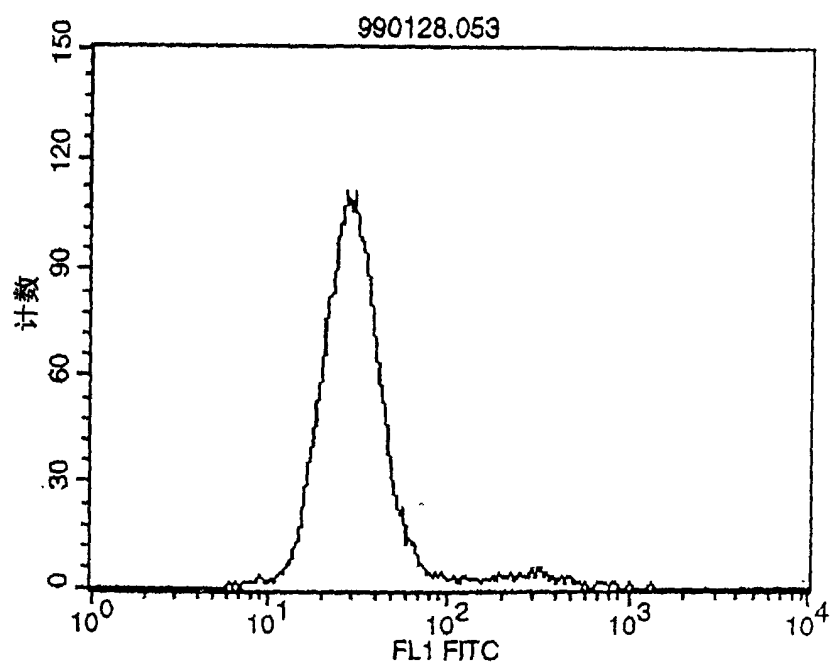


图 9

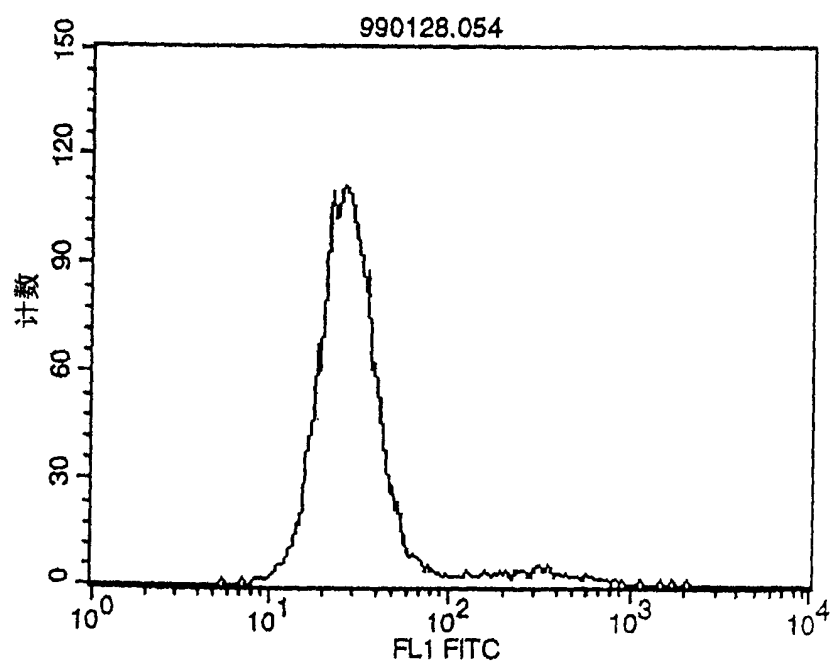


图 10

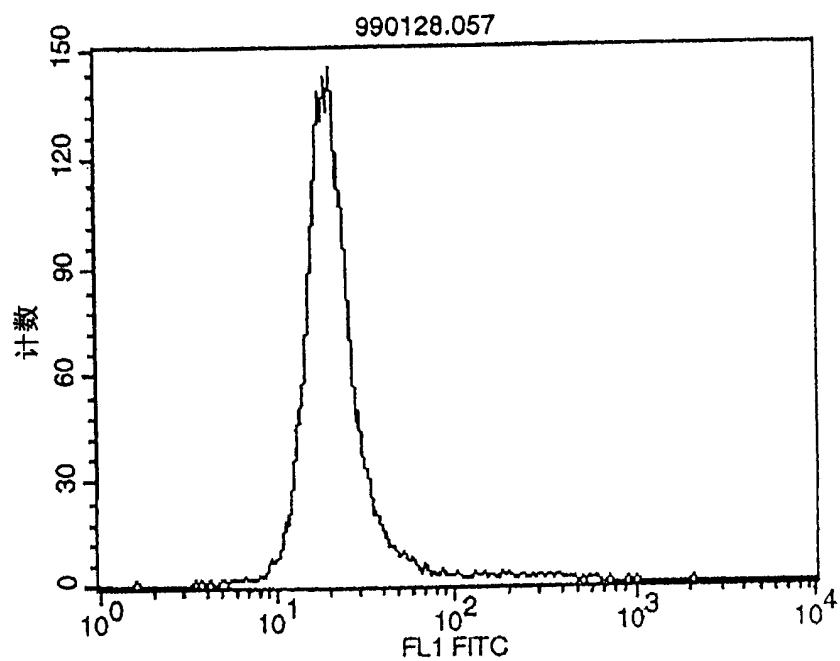


图 11

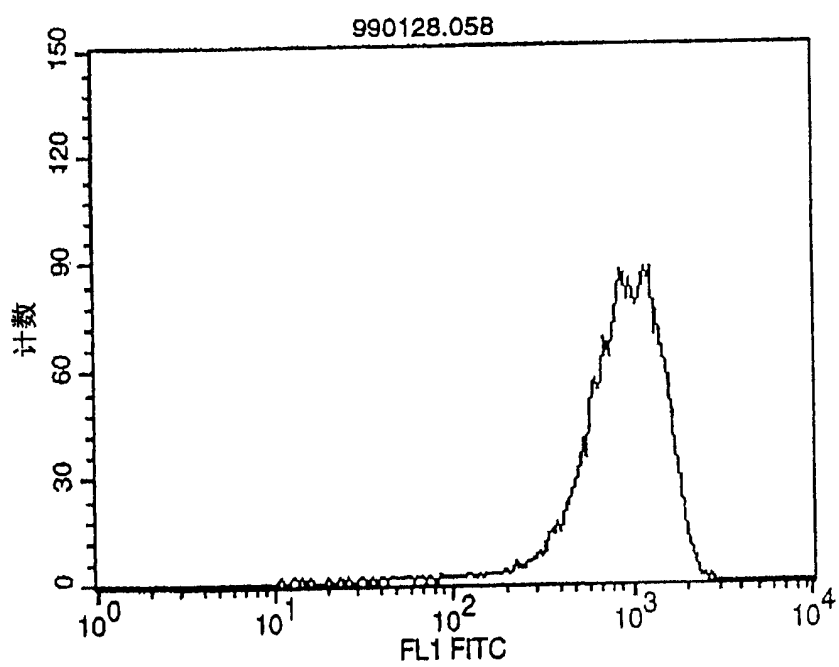


图 12

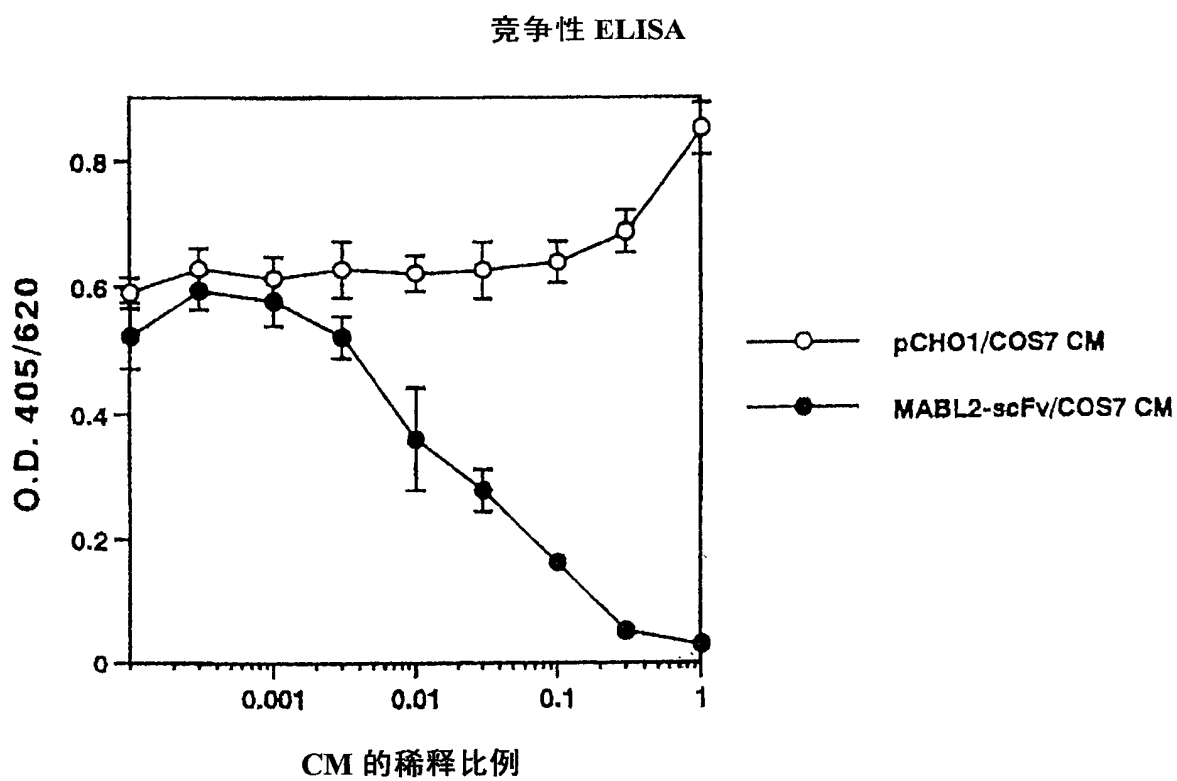


图 13

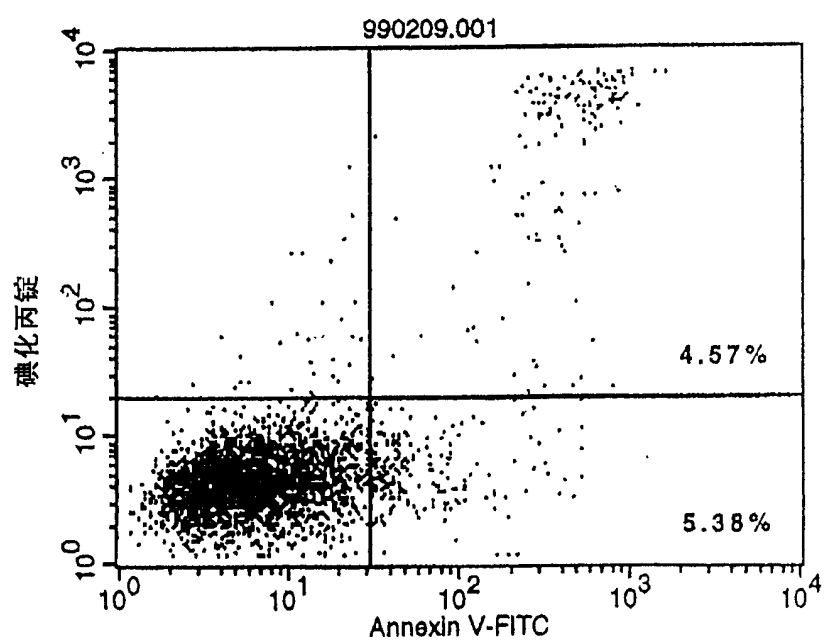


图 14

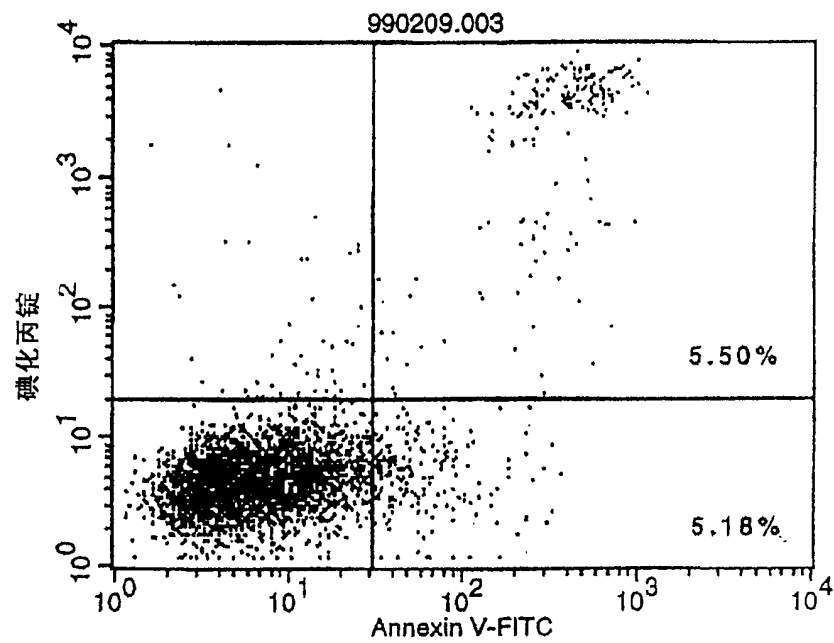


图 15

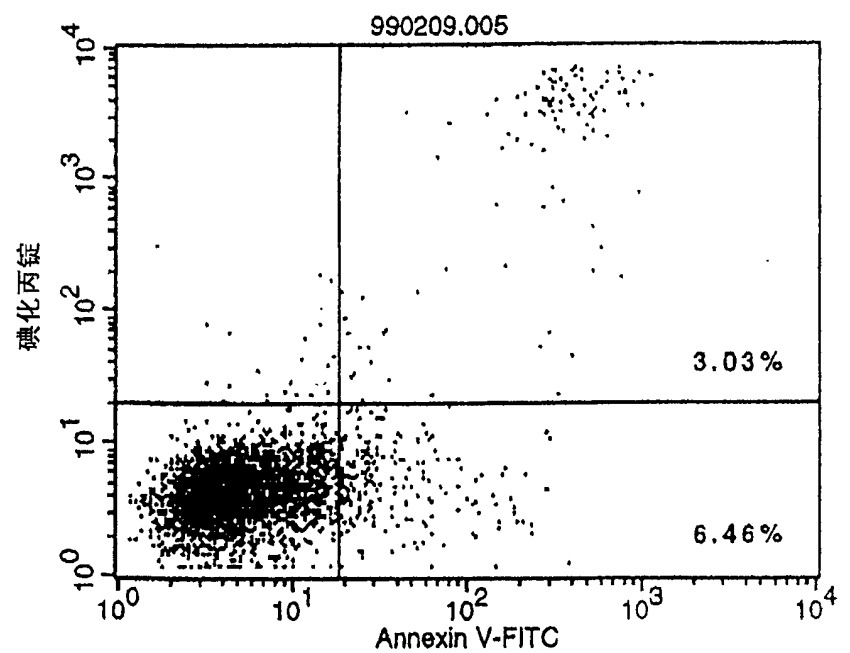


图 16

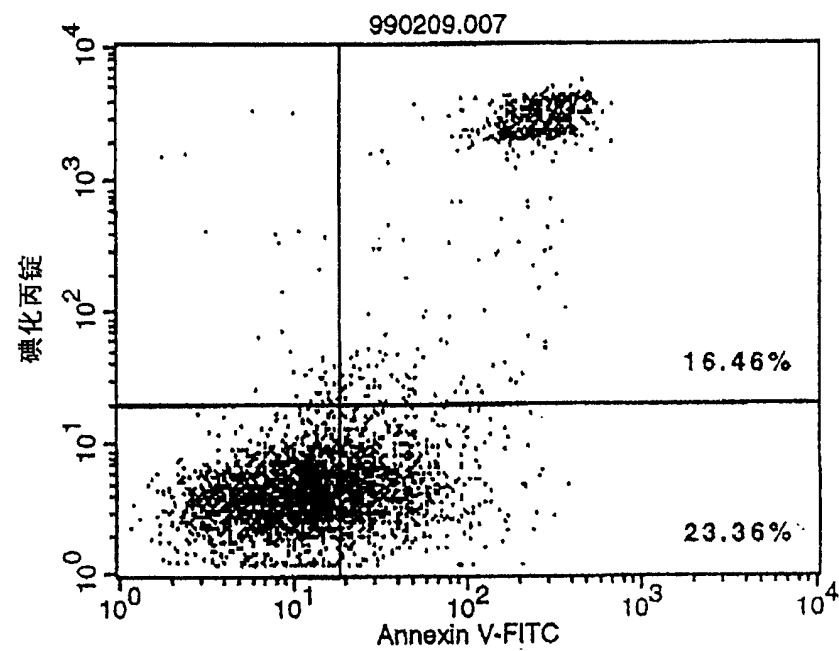


图 17

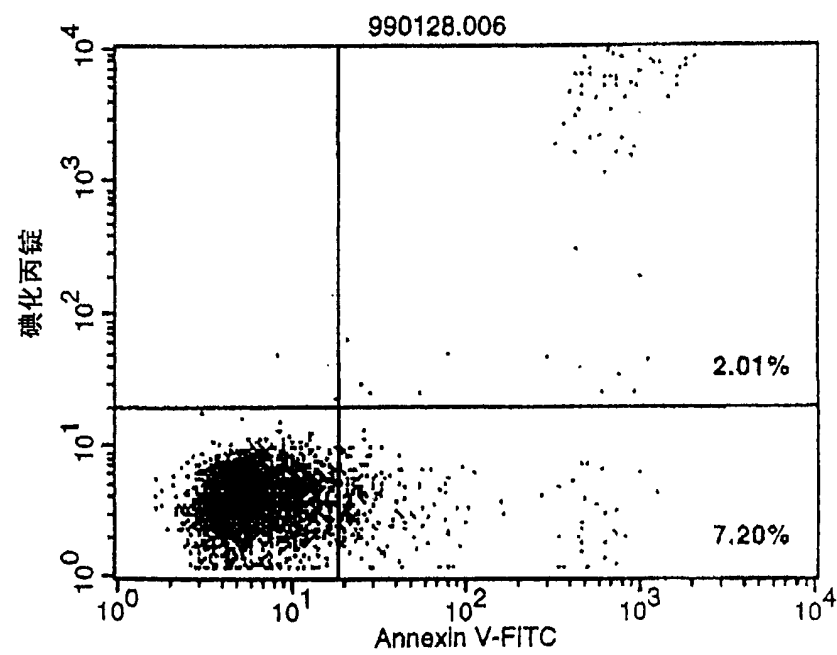


图 18

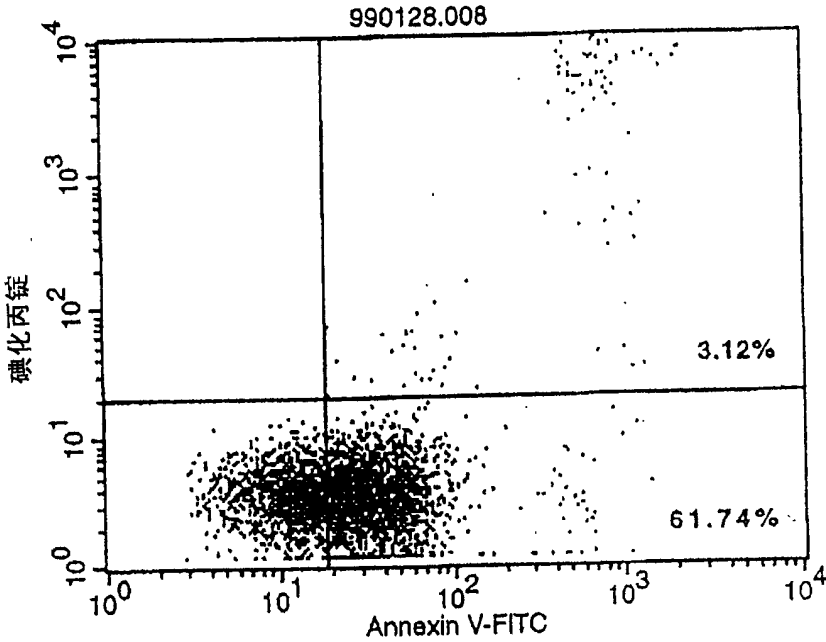


图 19

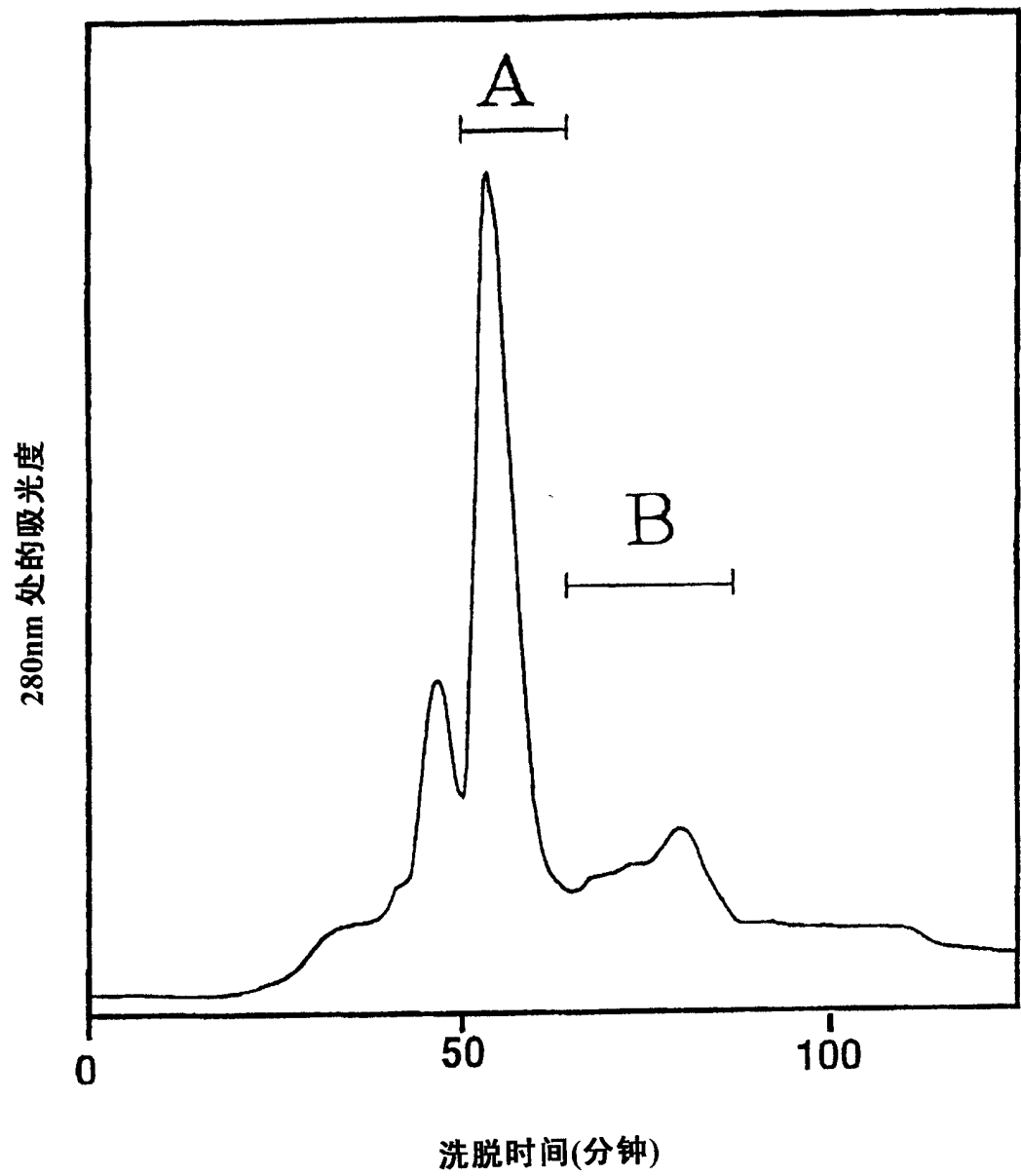


图 20

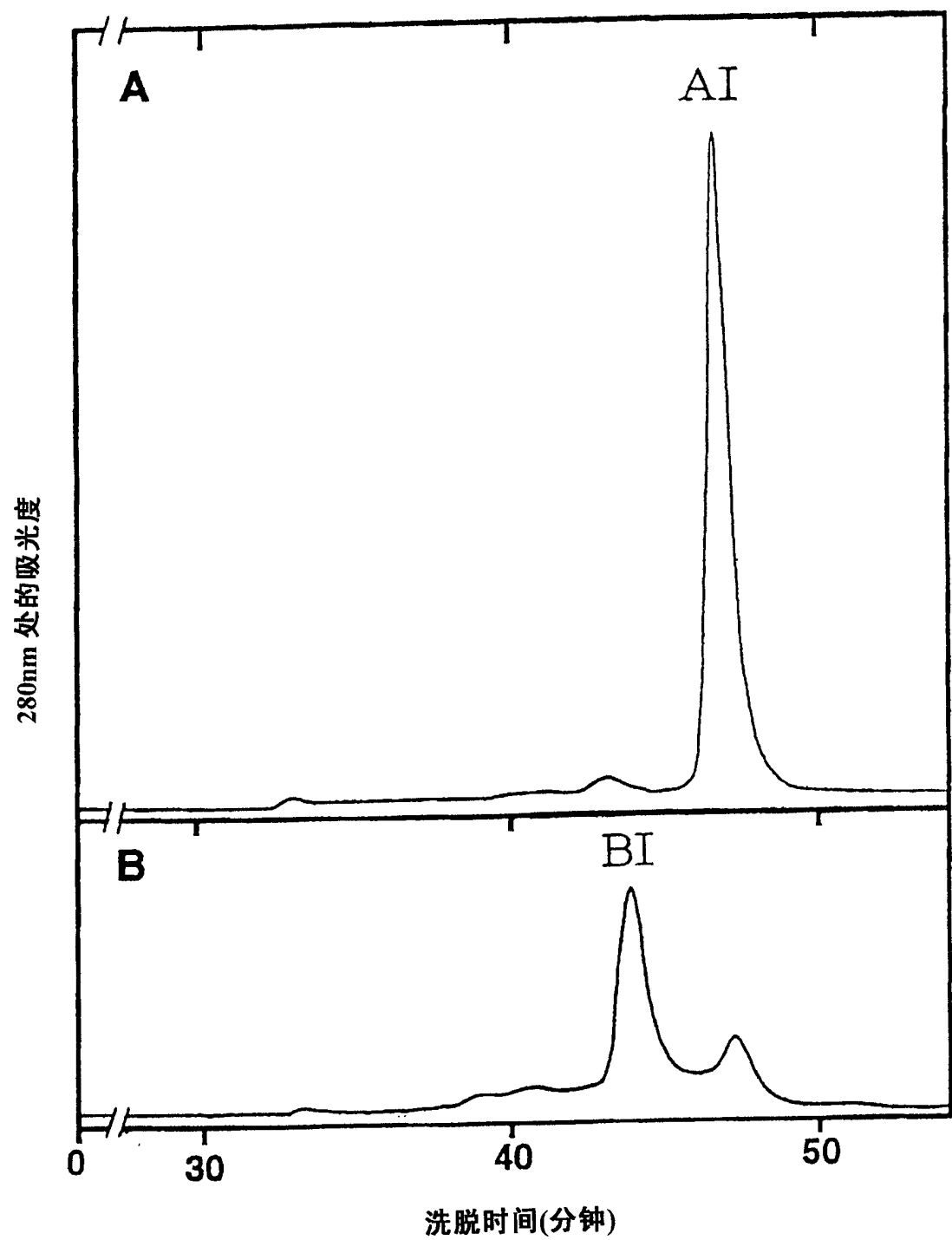
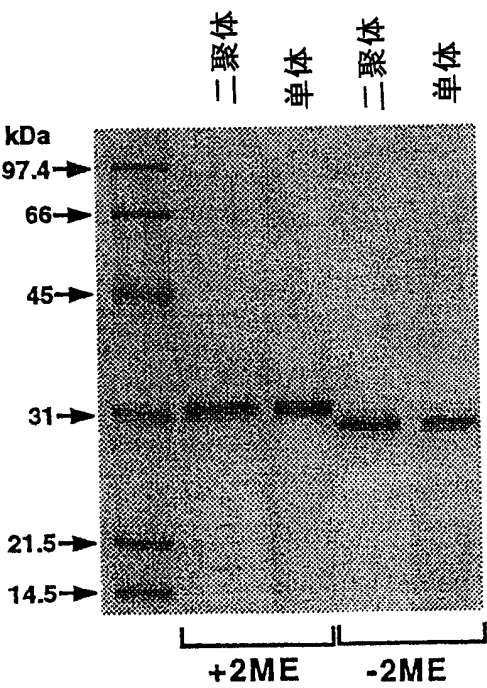


图 21

MABL2-scFv 的 SDS-PAGE 分析

<CHO>



<E. coli>

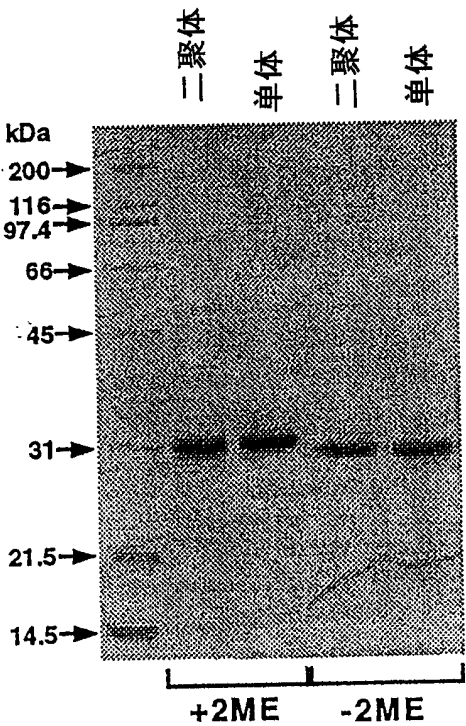


图 22

TSK 凝胶 G3000SW  
20mM 乙酸盐缓冲液 0.15M NaCl, pH6.0

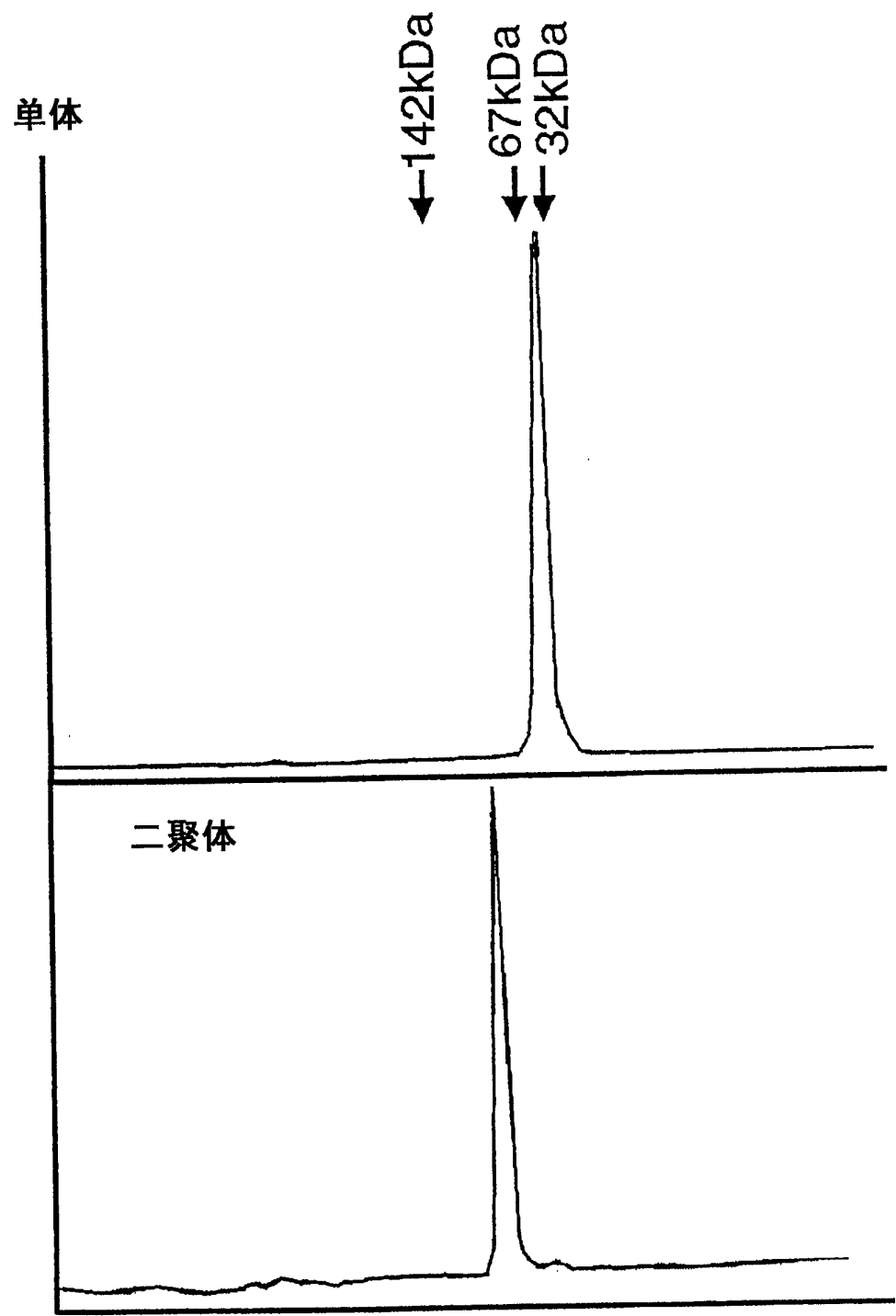
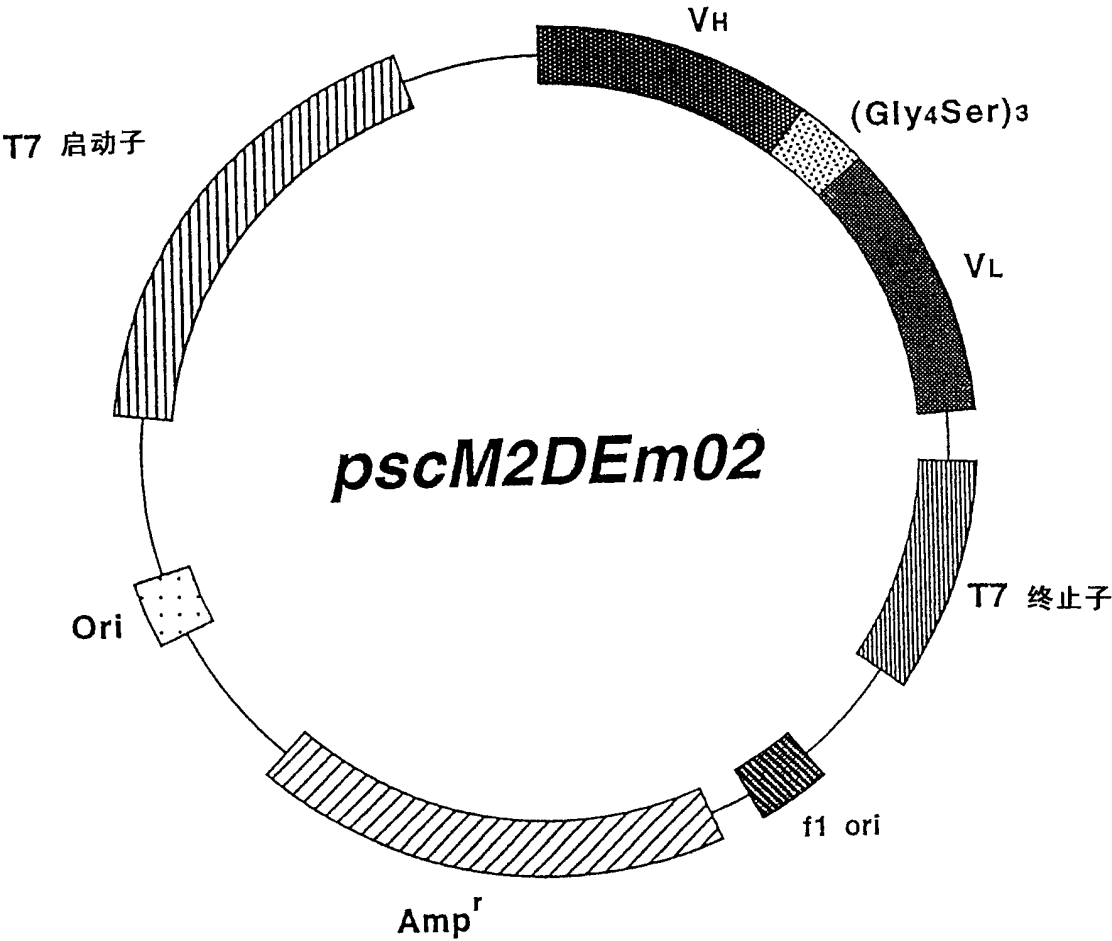


图 23



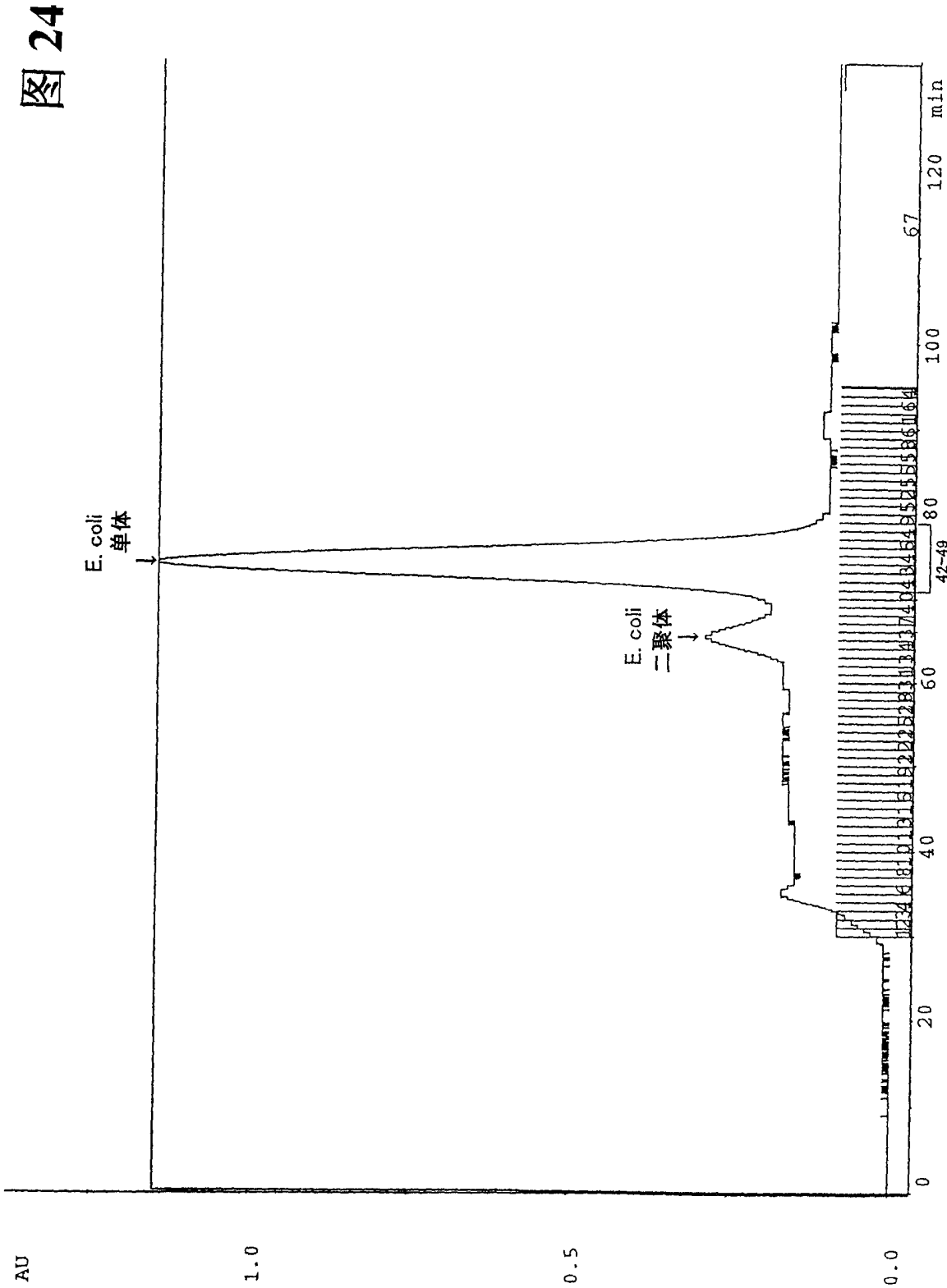


图 25

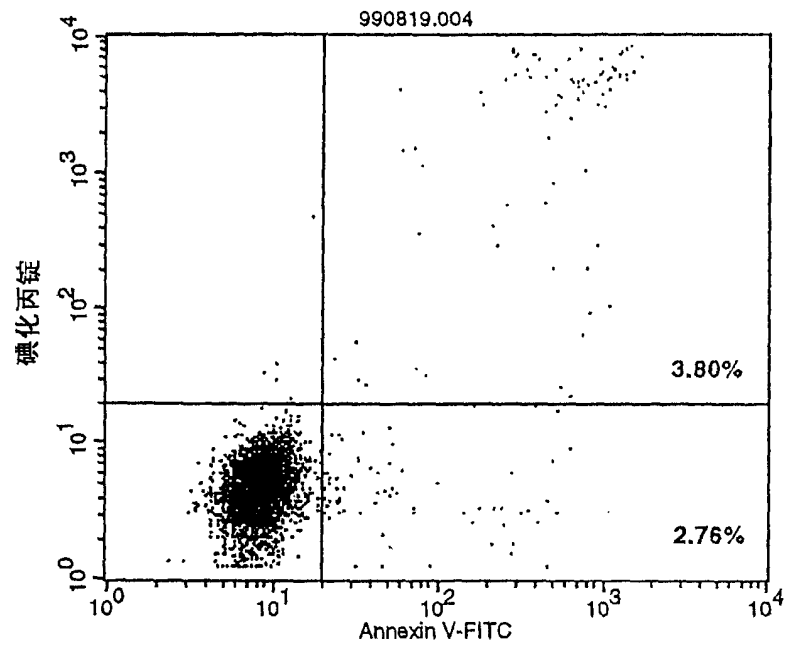


图 26

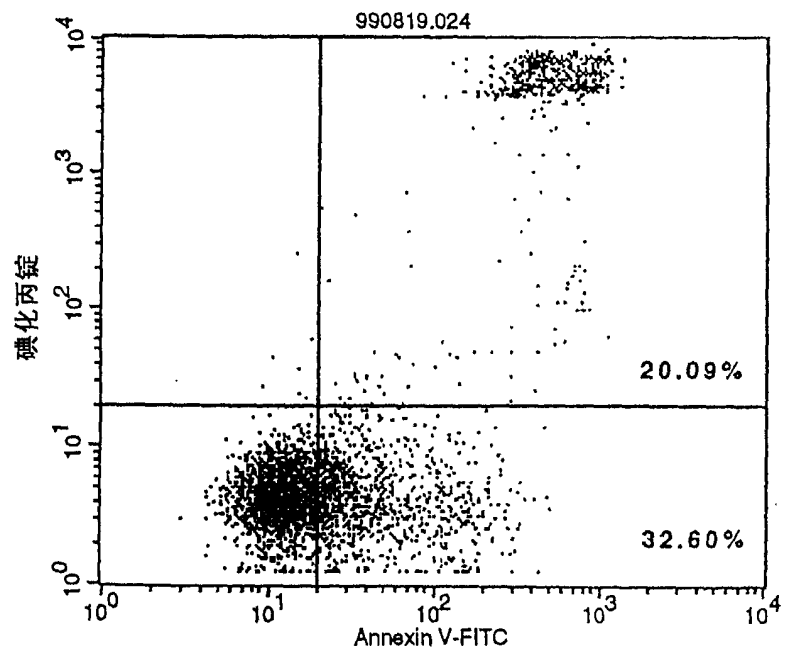


图 27

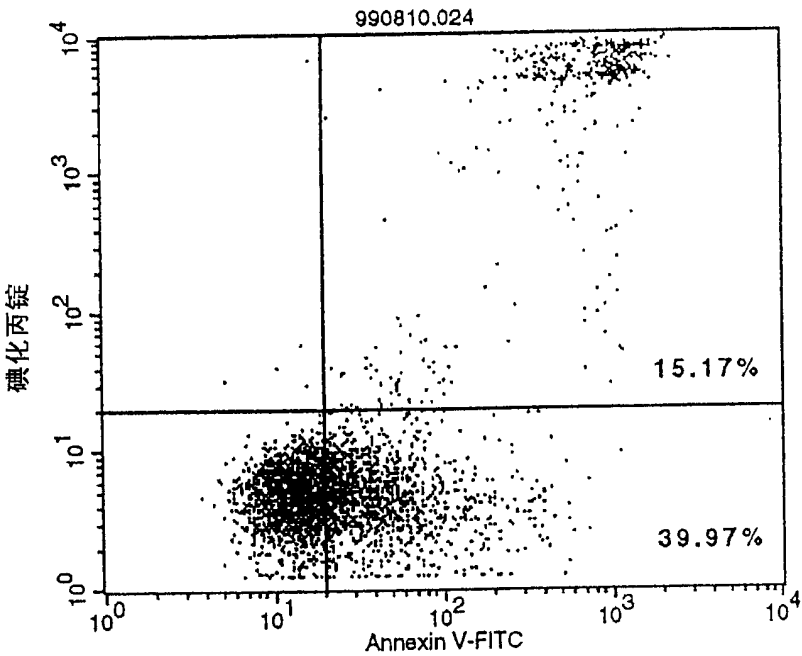


图 28

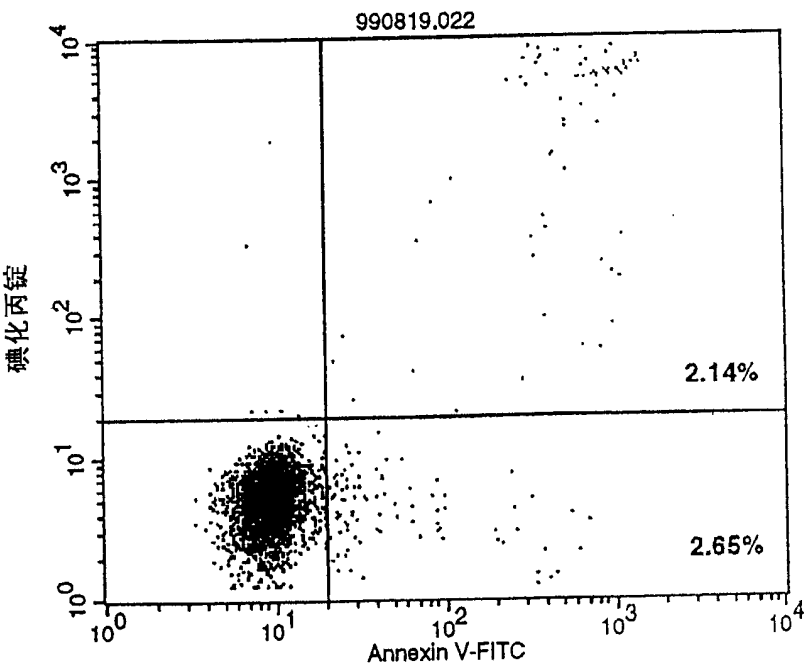


图 29

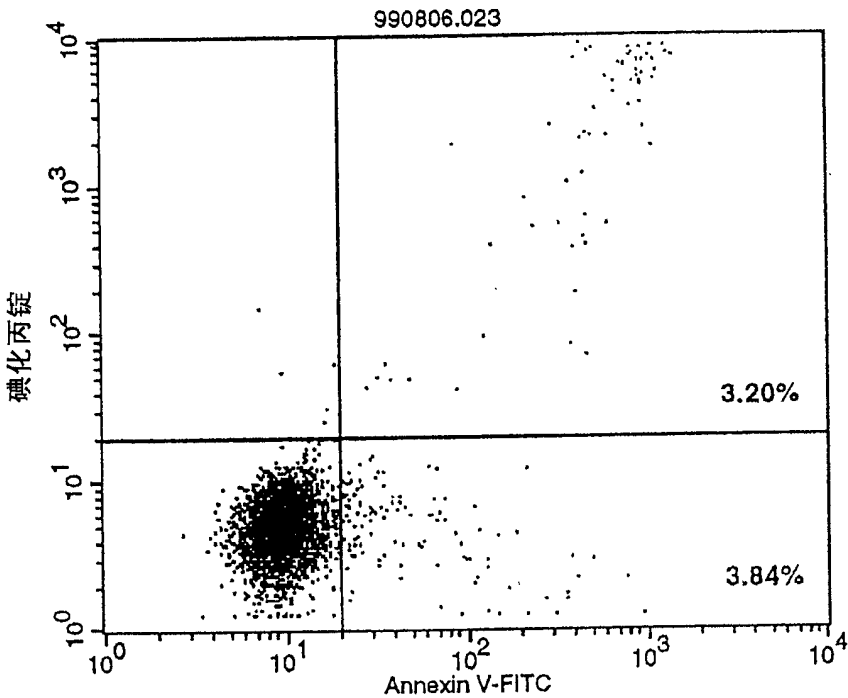


图 30

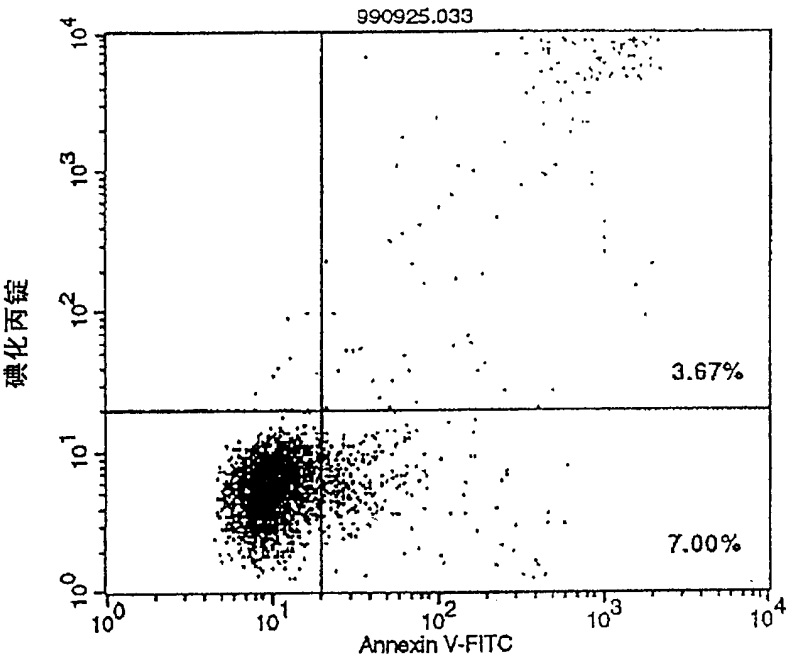


图 31

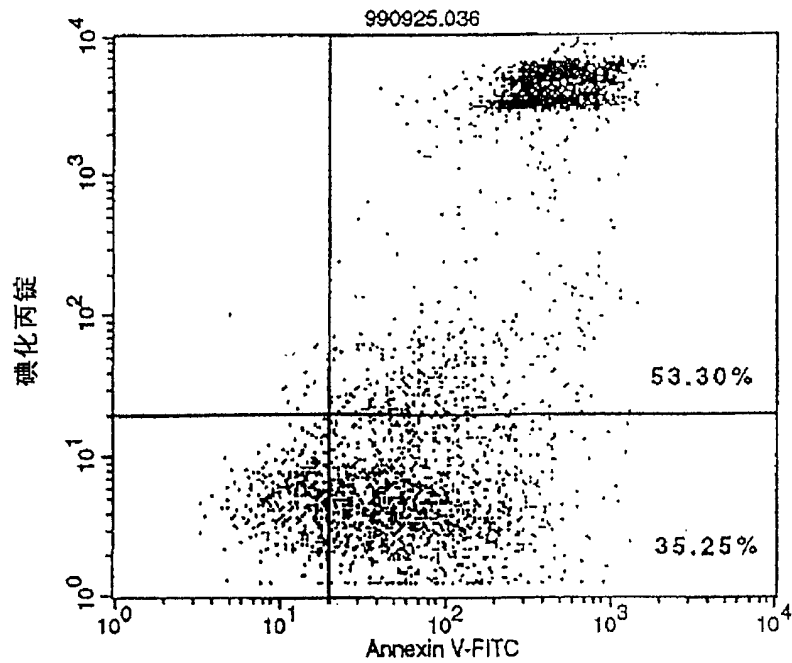


图 32

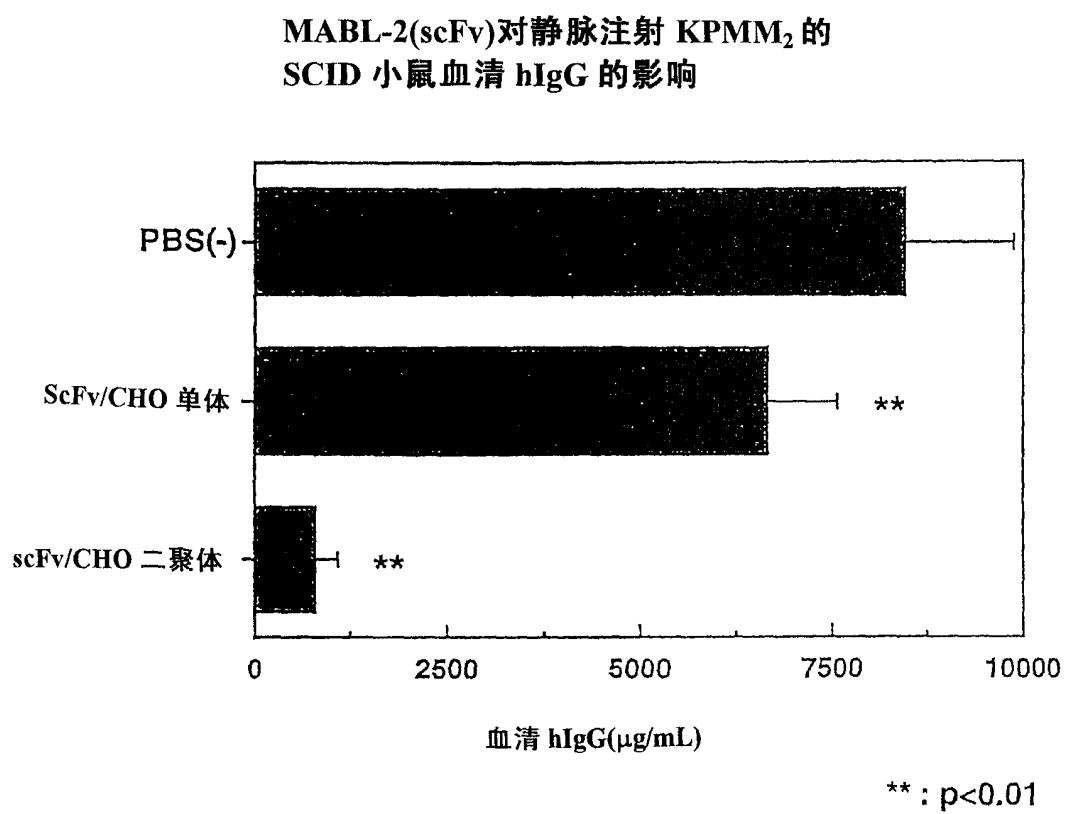


图 33

MABL-2(scFv)对静脉注射 KPMM<sub>2</sub> 的  
SCID 小鼠存活的影响

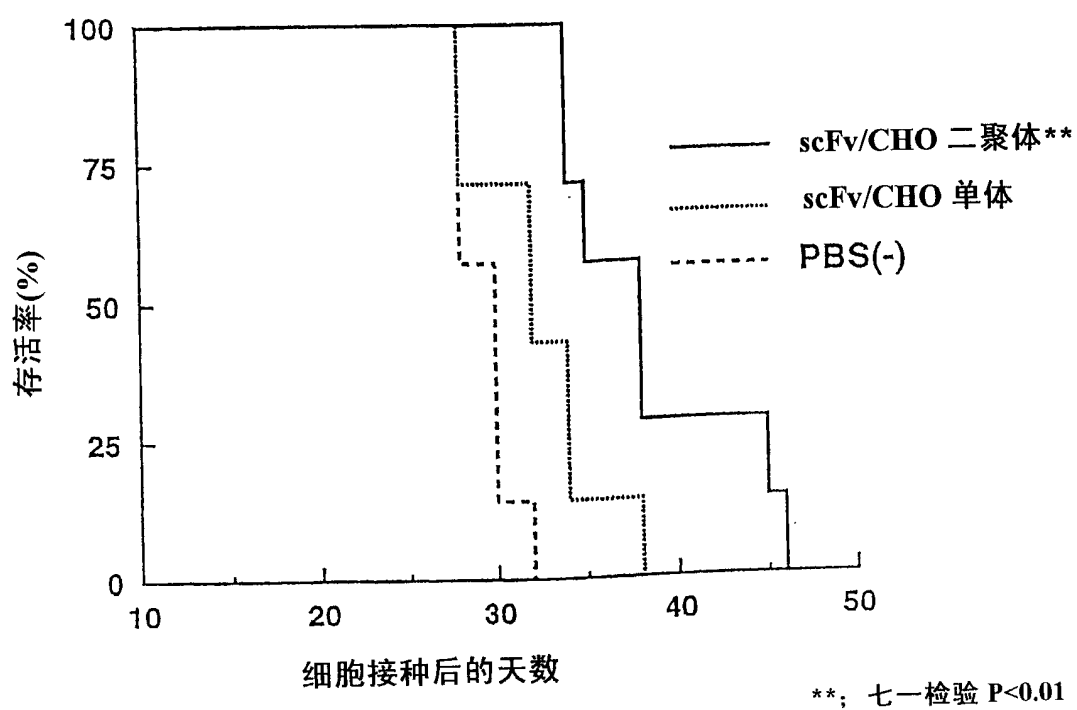


图 34

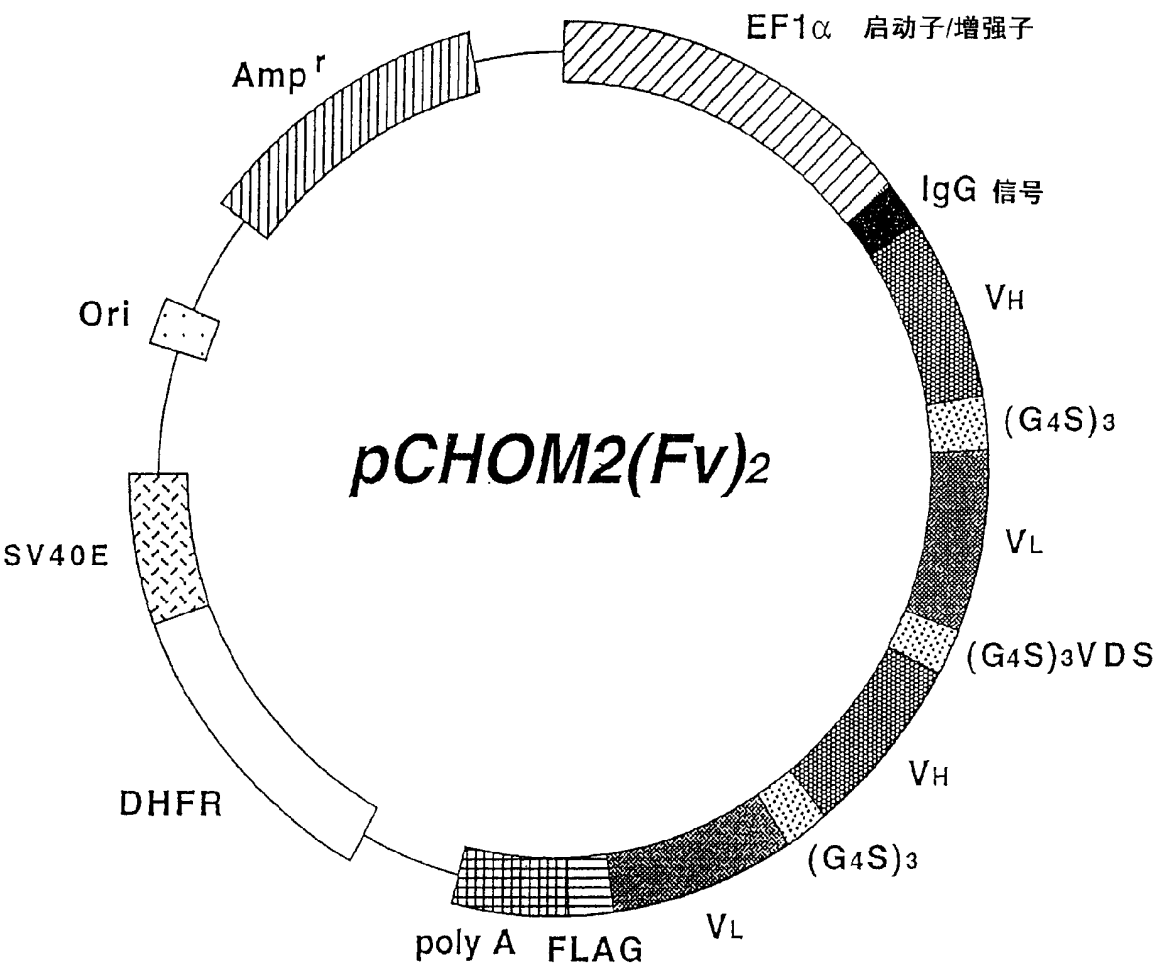


图 35

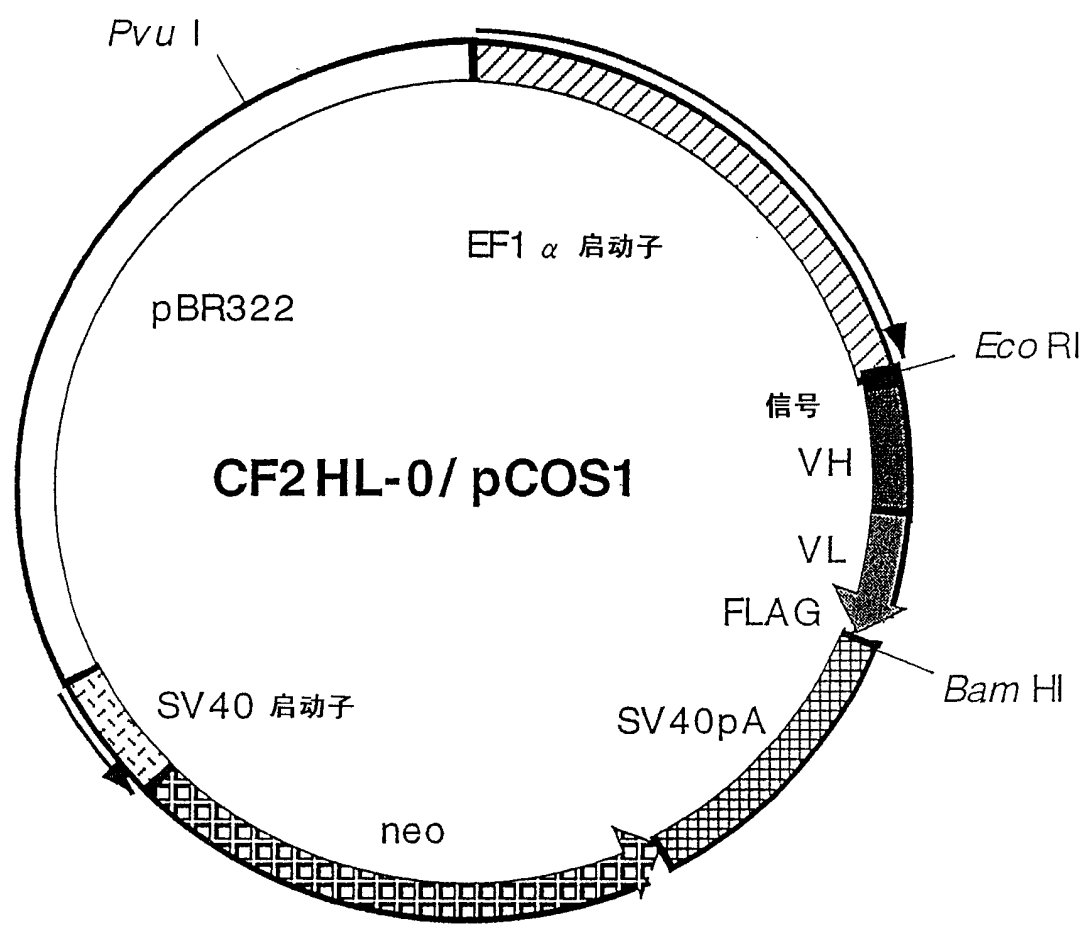


图 36

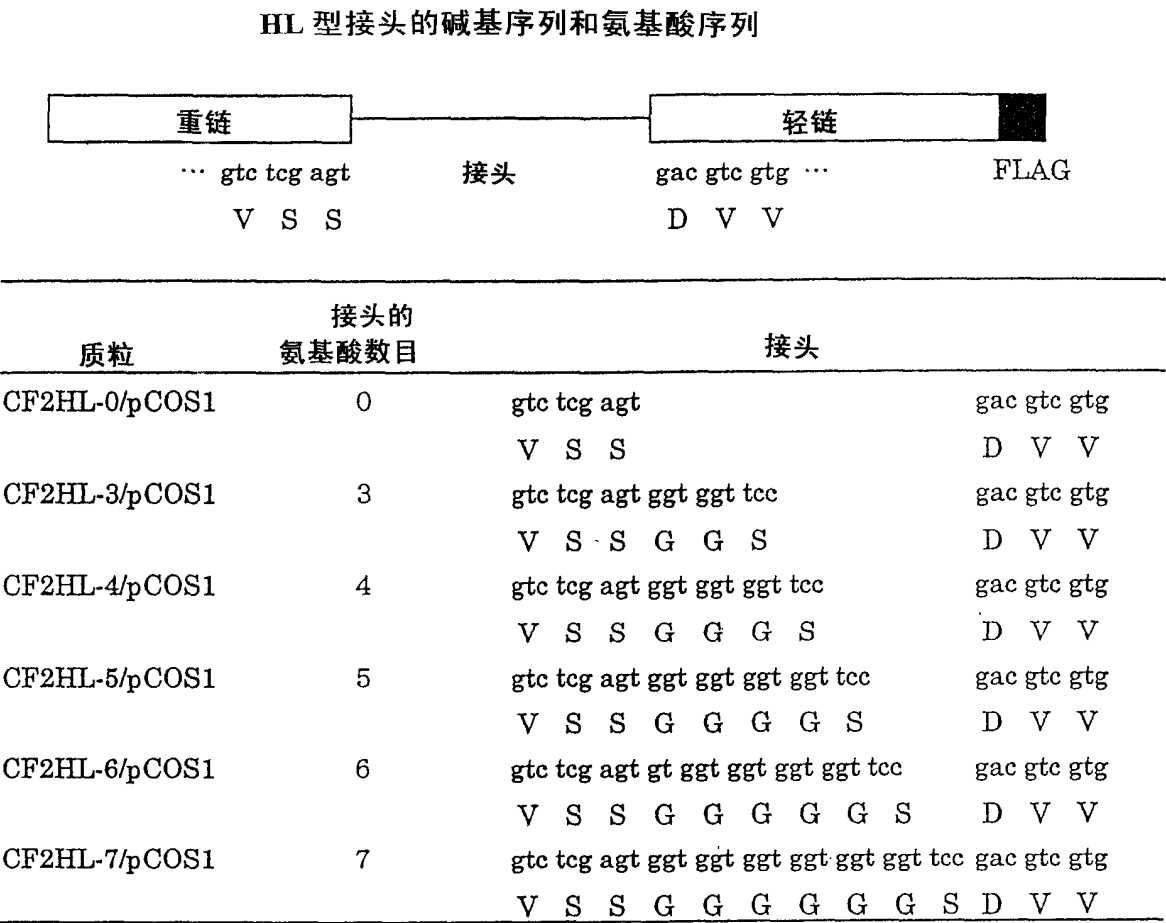


图 37

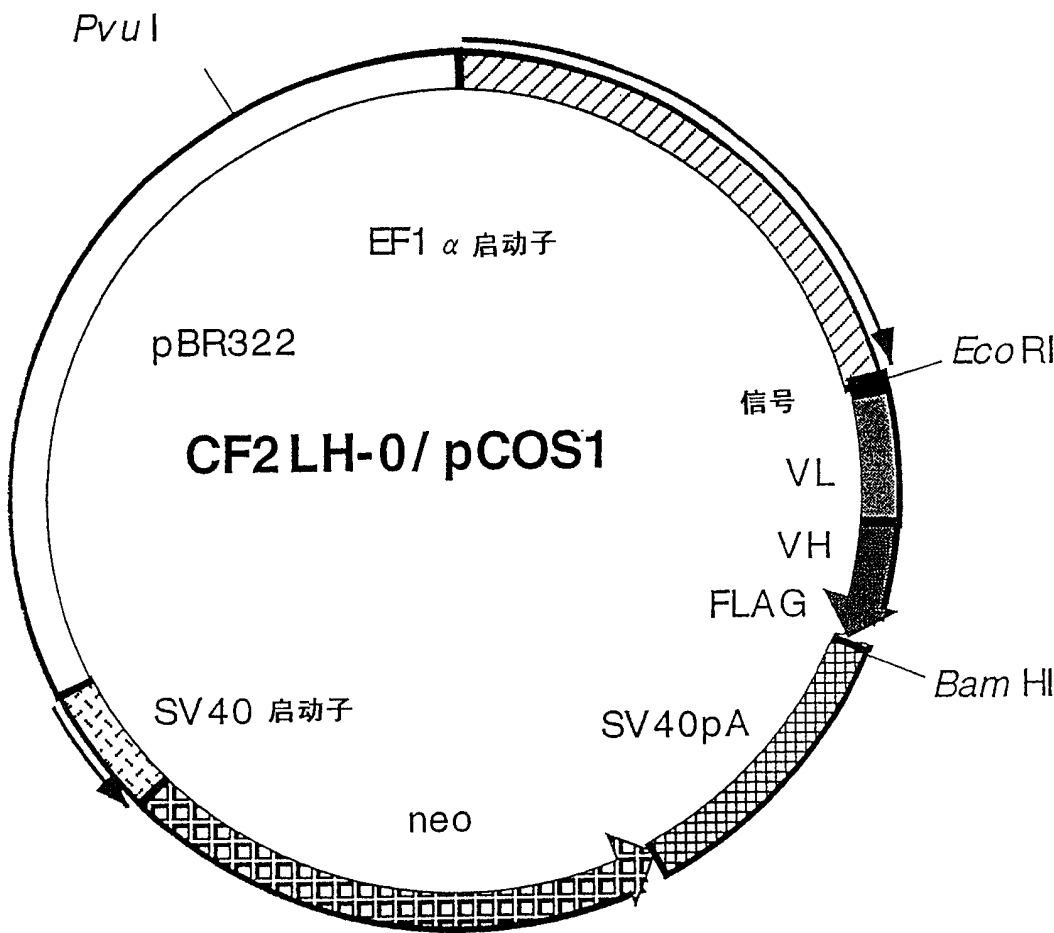


图 38

HL 型接头的碱基序列和氨基酸序列

| 轻链              |  | 重链              |  |
|-----------------|--|-----------------|--|
| ... gag ata aaa |  | cag gtc caa ... |  |
| E I K           |  | Q V Q           |  |
|                 |  | FLAG            |  |

| 质粒            | 接头的<br>氨基酸数目 | 接头                                                             | 接头                   |
|---------------|--------------|----------------------------------------------------------------|----------------------|
| CF2LH-0/pCOS1 | 0            | gag ata aaa<br>E I K                                           | cag gtc caa<br>Q V Q |
| CF2LH-3/pCOS1 | 3            | gag ata aaa tcc gga ggc<br>E I K S G G                         | cag gtc caa<br>Q V Q |
| CF2LH-4/pCOS1 | 4            | gag ata aaa tcc gga ggt ggc<br>E I K S G G G                   | cag gtc caa<br>Q V Q |
| CF2LH-5/pCOS1 | 5            | gag ata aaa tcc gga ggt ggt ggc<br>E I K S G G G G             | cag gtc caa<br>Q V Q |
| CF2LH-6/pCOS1 | 6            | gag ata aaa tcc gga ggt ggt ggt ggc<br>E I K S G G G G G       | cag gtc caa<br>Q V Q |
| CF2LH-7/pCOS1 | 7            | gag ata aaa tcc gga ggt ggt ggt ggt ggc<br>E I K S G G G G G G | cag gtc caa<br>Q V Q |

图 39

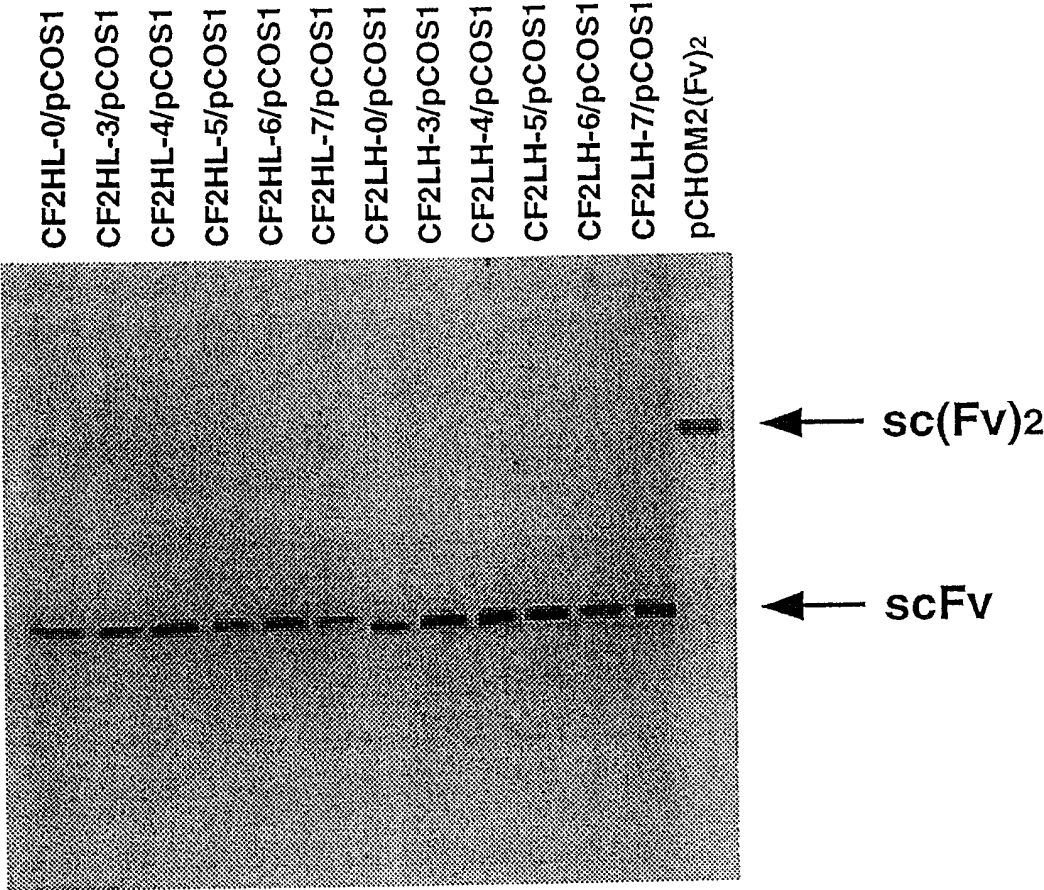


图 40a

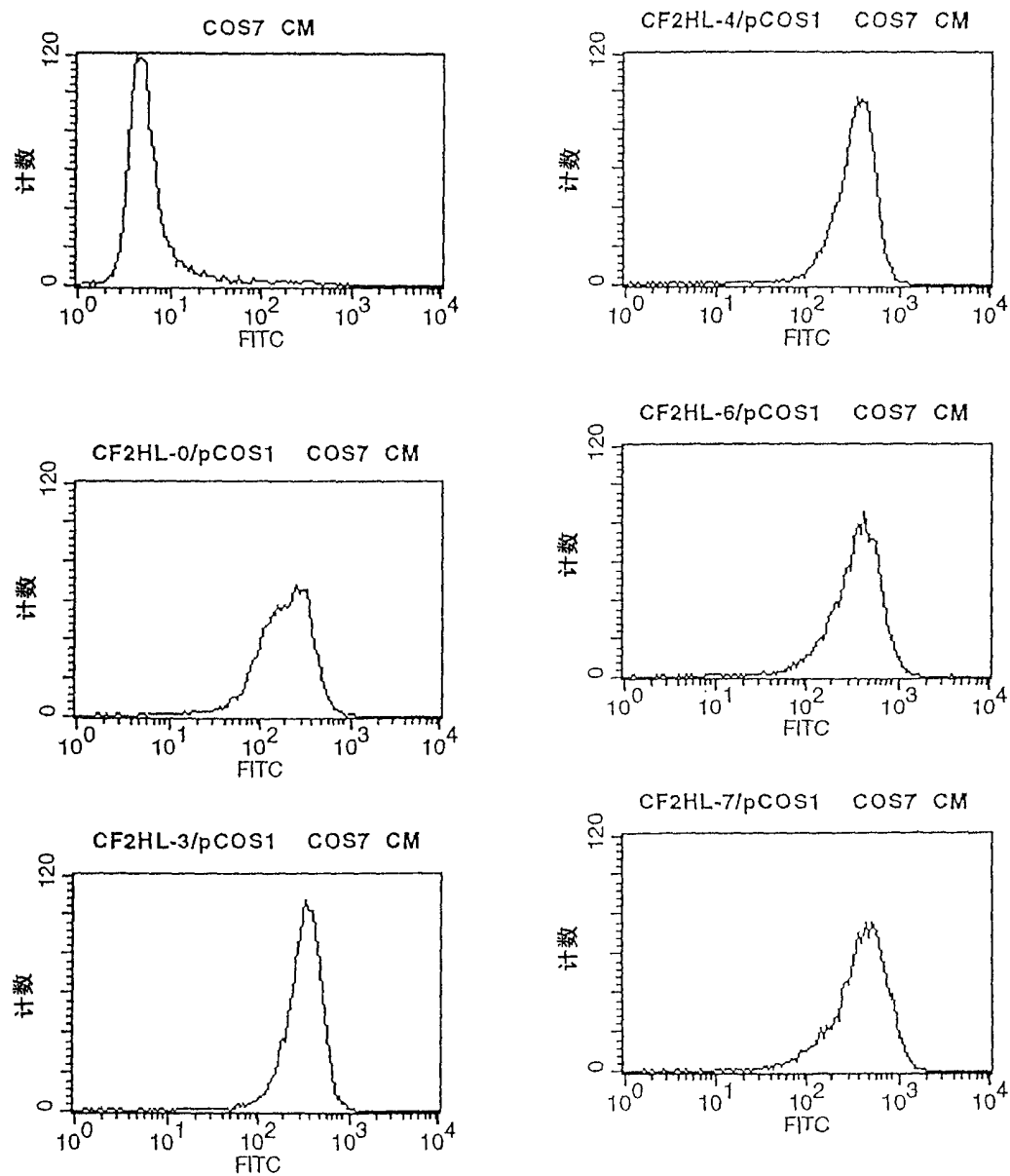


图 40b

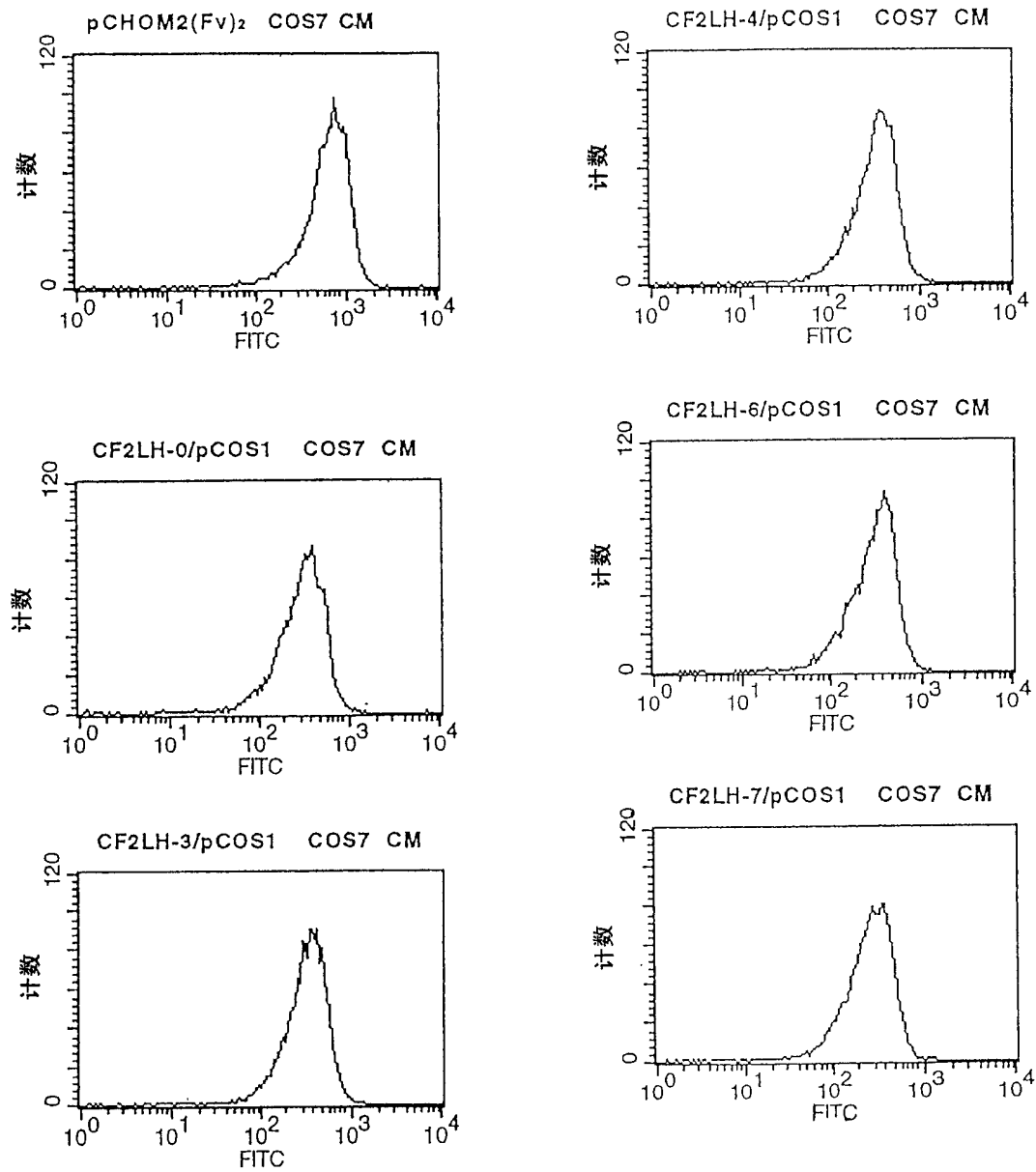


图 41

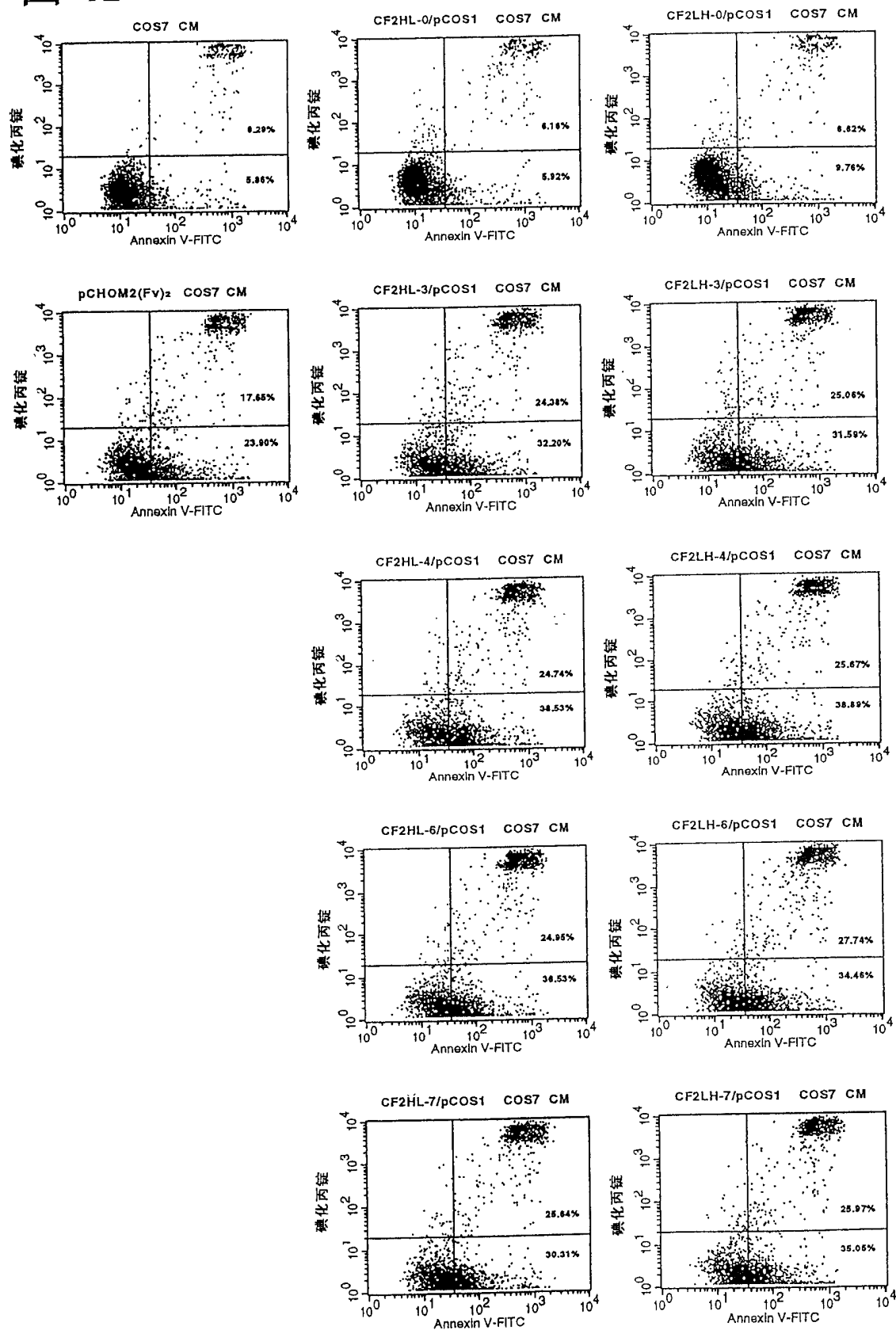


图 42

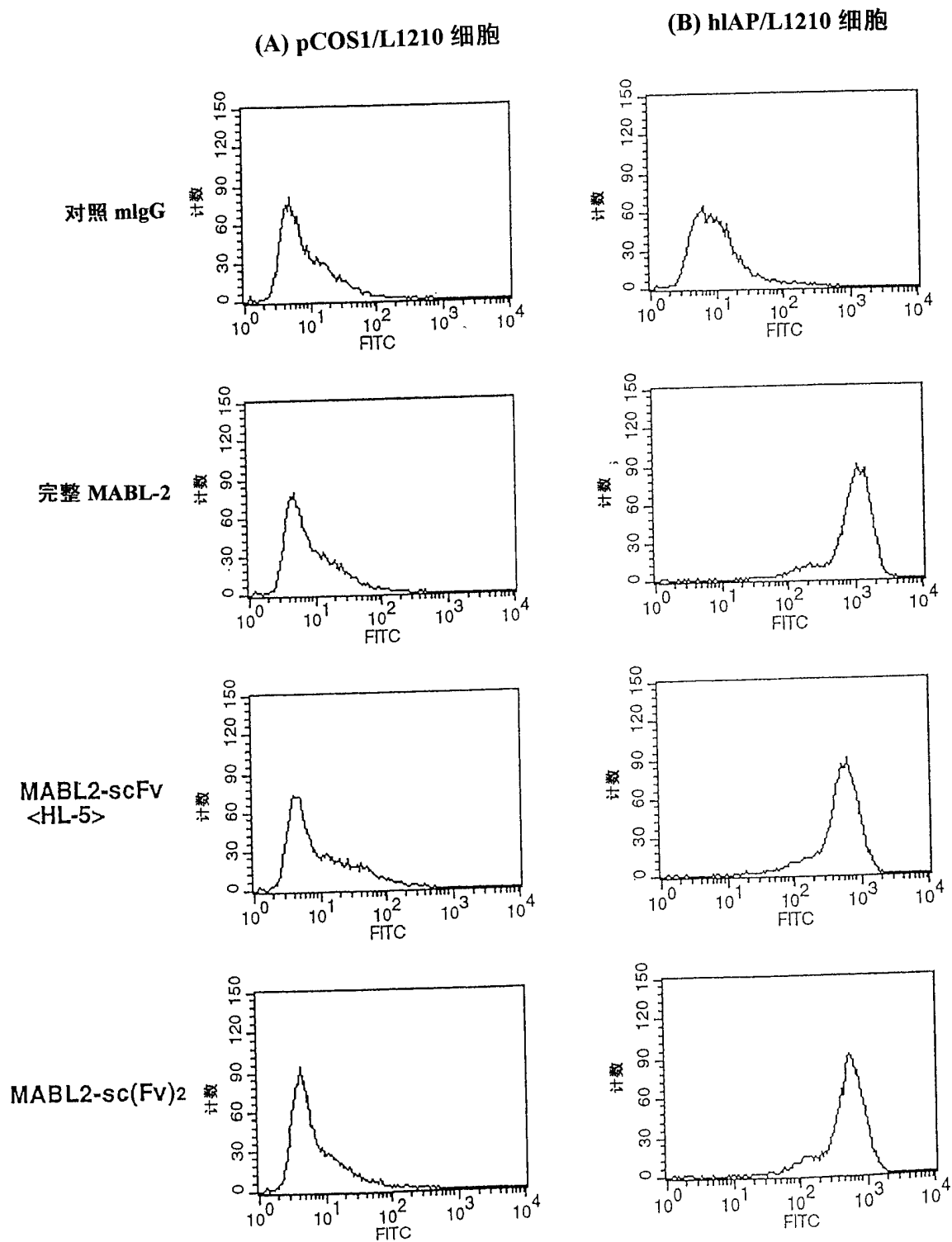


图 43

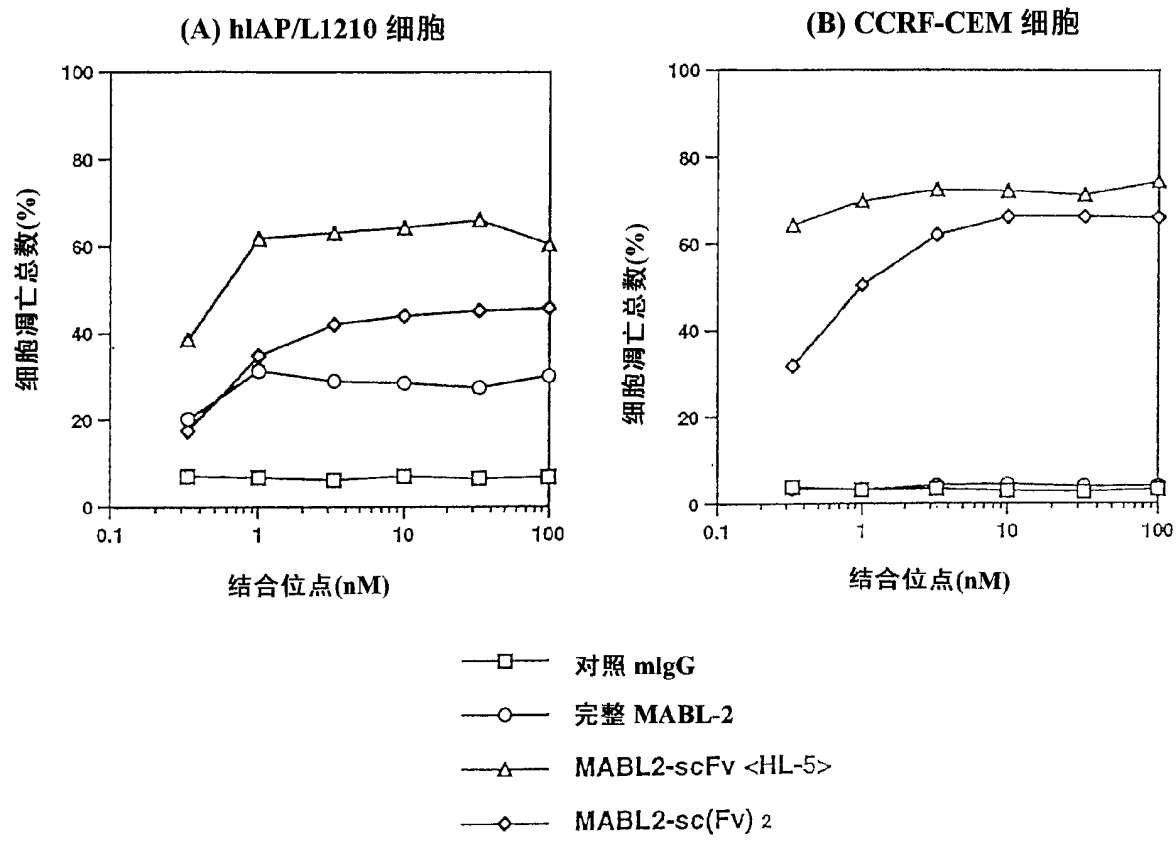


图 44

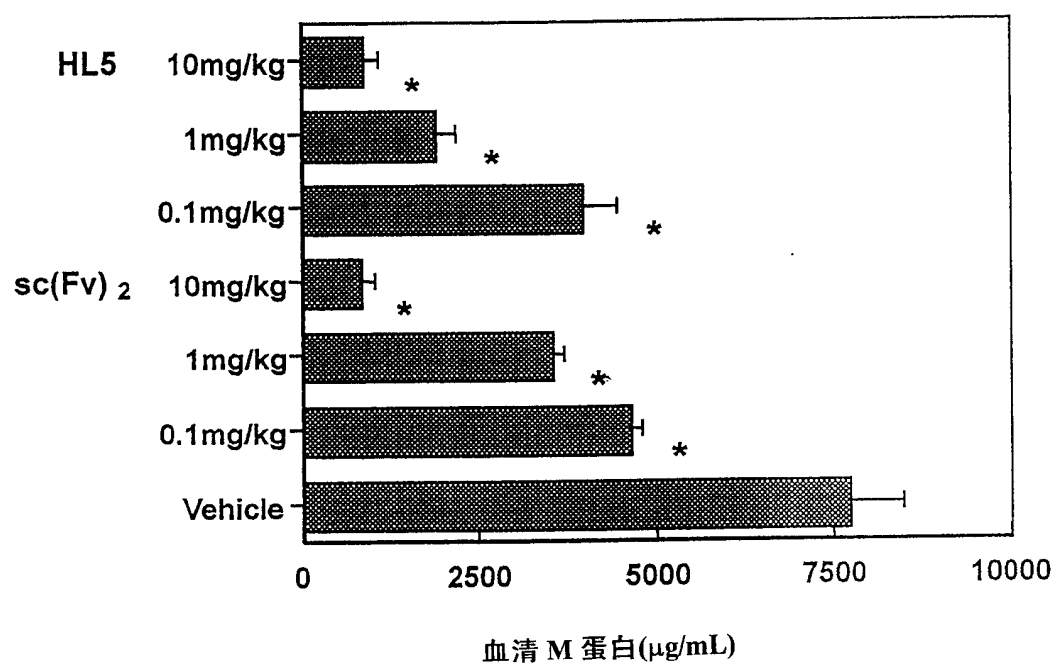


图 45

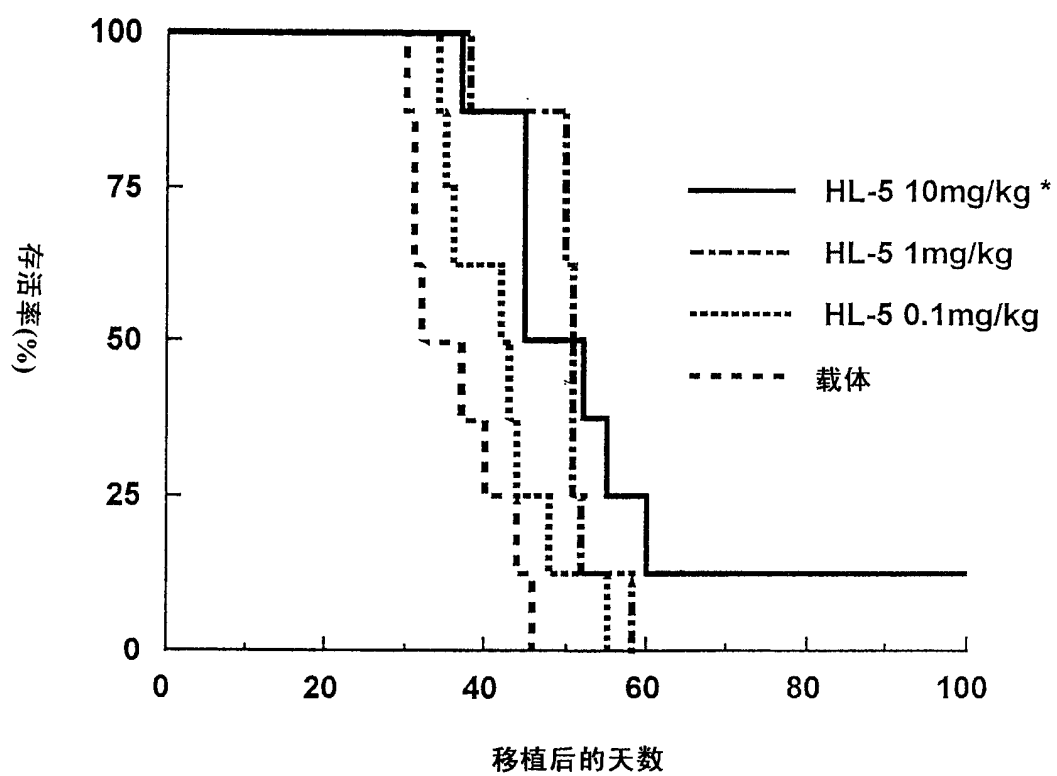


图 46

